

Zur Analytik der Isoflavone

Hans Grasmaier

Zur Analytik der Isoflavone

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München



vorgelegt

von

Apotheker

Hans Grasmaier

aus

Mainburg

Juli 1959

5349/60

1. Berichterstatter: Professor Dr. L. H ö r h a m m e r
2. Berichterstatter: Professor Dr. E. B a m a n n
Tag der mündlichen Prüfung: 18.11. 1959

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

A. Einleitung	1
B. Allgemeiner Teil	3
I. Systematische Untersuchungen an Isoflavonen	3
1. Isolierung von Genistein	4
2. Untersuchung einer Isoflavon-Farbreaktion	5
3. Papierchromatographie der Isoflavone	8
4. Alkaliabbau	12
II. Spektren der Isoflavone	13
1. UV-Spektrophotometrie	13
a) Normalspektren	13
b) Spektrenverschiebungen	15
2. IR-Spektroskopie	18
III. Papierchromatographische Untersuchung einheimischer Futterleguminosen	22
IV. Isolierungen aus <i>Lupinus polyphyllus</i> Lindl.	25
1. Isolierung von <i>Lupinus</i> -Substanz A	25
2. Strukturaufklärung von <i>Lupinus</i> -Substanz A ₁ ...	27
Arbeiten am Glykosid A ₁	27
Identifizierung des Aglykons	31
Zuckeranteil der Substanz A ₁	33
Zusammenfassung	34
3. Nebeninhaltsstoffe	34
<i>Lupinus</i> -Substanz A ₂	34
<i>Lupinus</i> -Substanzen B und C	36
V. Untersuchungen an <i>Trifolium campestre</i> Schreb. ...	37
1. Isolierung von <i>Trifolium</i> -campestre-Substanz X ₂	37

2. Versuche zur Konstitutionsaufklärung von	
Trifolium-campestre-Substanz X_2	38
Arbeiten am Glykosid X_2	38
Nähere Charakterisierung des Aglykons	42
Zuckeranteil der Substanz X_2	44
Zusammenfassung	45
C. Experimenteller Teil	46
I. Systematische Untersuchungen an Isoflavonen	46
1. Herkunft der Substanzen	46
2. Isolierung von Genistein	46
3. Papierchromatographie	47
II. Spektrophotometrische Untersuchungen	48
1. UV-Spektren	48
2. IR-Spektren	48
III. Isolierungen aus Lupinus Polyphyllus Lindl.	49
1. Isolierung von Substanz A_1	49
2. Identifizierung der Substanz A_1	51
a) Eisenchloridtest	51
b) UV-Spektrum	51
c) Hydrolyse	51
d) Azetylierung	52
e) Alkaliabbau	52
f) Zuckernachweis	53
3. Lupinus-Substanz A_2	54
a) Hydrolyse	54
b) Zuckernachweis	54
IV. Trifolium-campestre-Schreb.-Substanz X_2	56
1. Isolierung	56
2. Hydrolyse	57
3. Azetylierungsversuche	57
4. Prüfung auf Flavanonstruktur	58
5. Prüfung auf Isoflavonstruktur	58
A n h a n g	60

A. Einleitung

Neben den Flavonen gewann die weitaus kleinere Gruppe der Isoflavone erst in jüngster Zeit an Bedeutung.

Das erste Isoflavon wurde schon im Jahre 1899 isoliert¹⁾, allerdings erst ein Vierteljahrhundert später als solches erkannt²⁾³⁾. Vor wenigen Jahren stellte man fest, daß es sich dabei um biologisch aktive Stoffe handelte. H. W. BENNETS, E. J. UNDERWOOD und F. L. SHIER⁴⁾ in Australien und C. C. CULBERTSON⁵⁾ in U.S.A. fanden fast gleichzeitig, daß in verschiedenen Futterleguminosen oestrogene Stoffe vorhanden sein mußten. R. B. BRADBURY und D. E. WHITE⁶⁾ gelang im Jahre 1951 die Isolierung des Isoflavons Genistein aus der australischen Kleeart *Trifolium subterraneum* L. J. D. BIGGERS und D. H. CURNOW⁷⁾ konnten 1953 zeigen, daß es sich dabei um den oestrogen aktiven Stoff in dieser Pflanze handelt.

In Amerika war das Interesse an oestrogenen Isoflavonen drei Jahre vorher erwacht, als man beobachtete, daß der wachstumstimulierende Effekt von Stilboestrol-Implantationen bei solchen Tieren ausblieb, die vorwiegend mit Alfalfa-Gras und Kleeheu gefüttert wurden⁵⁾.

Die Versuche, in diesen Pflanzen eventuell vorkommende Oestrogene aufzufinden, führten schließlich zur Isolierung einiger Isoflavone, z. B. Biochanin A und Formononetin aus *Trifolium*

1) A.G.PERKIN u. P.G.NEWBURY, J.chem.Soc.(London) 75, 830 (1899)

2) H.FINNEMORE, Pharmac.J. 31, 604 (1910)

3) W.BAKER u. R.ROBINSON, J.chem.Soc.(London) 127, 1981 (1925)

4) H.W.BENNETS, E.J.UNDERWOOD u. F.L.SHIER, Australian veterin. J. 22, 2 (1946)

5) C.C.CULBERTSON, C.W.McDONALD, W.BURROUGHS, P.S.SHEARER u. W.E.HAMMOND, A.H.Leaflet NO. 181, Iowa Exptl.Stat. (1952)

6) R.B.BRADBURY u. D.E.WHITE, J.chem.Soc.(London) 3447 (1951)

7) J.D.BIGGERS u. D.H.CURNOW, Biochem.J. 58, 278 (1954)

pratense L.⁸⁾⁹⁾. Nicht alle Isoflavone erwiesen sich als oestrogen aktiv. Nach D. G. WENZEL und P. ROSENBERG¹⁰⁾ tragen alle bisher als oestrogen aktiv erkannten Isoflavone eine Hydroxylgruppe am C-Atom 5. In allerjüngster Zeit scheint es, als ob sich die biologische Aktivität der Isoflavone nicht nur auf den Bereich der oestrogenen Wirksamkeit beschränken würde. A. I. VIRTANEN¹¹⁾, der die Bedeutung antimikrobieller Substanzen in Kulturpflanzen für deren Widerstandsfähigkeit sowie für die Ernährung der Haustiere und des Menschen untersucht hat, hält es für wahrscheinlich, daß diese Stoffe insbesondere durch ihre antifungale Wirkung wichtige Schutzstoffe gegen Pflanzenkrankheiten sind. So zeigten das aus dem Rotklee stammende 7-Hydroxy-4'-methoxy-isoflavon und eine weitere Substanz A₁ (C₁₈H₁₄O₆), deren Struktur noch nicht aufgeklärt ist, Aktivität gegen den die Kleefäule verursachenden Pilz Sclerotinia trifoliorum.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Hinblick auf die oestrogene Aktivität verschiedener Isoflavone einheimische Futterleguminosen auf das Vorkommen solcher Stoffe zu untersuchen und nach Möglichkeit Substanzen zu isolieren, bei denen auf Grund ihres papierchromatographischen Verhaltens mit dem Vorliegen einer Isoflavonstruktur gerechnet werden kann.

8) E.C.BATE-SMITH u. T.SWAIN, Chem. and Ind. 1127 (1953)

9) G.S.POPE u. P.V.ELCOATE, Chem. and Ind. 1092 (1953)

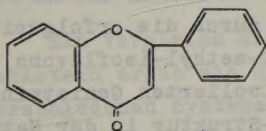
10) D.G.WENZEL u. P.ROSENBERG, J.Amer.pharmac.Assoc.,sci.Edit. Nr. 6 (1956)

11) A.I.VIRTANEN, Angew.Chem. 17/18, 344 (1958)

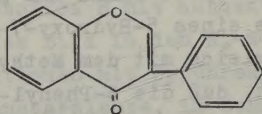
B. Allgemeiner Teil

I. SYSTEMATISCHE UNTERSUCHUNGEN AN ISOFLAVONEN

Bevor an eine systematische Untersuchung einheimischer Futterleguminosen auf den Gehalt an Isoflavonen herangegangen werden konnte, war es erforderlich, möglichst viele Kriterien zu finden, die schon früh im Isolierungsgang erkennen lassen, ob es sich bei dem zu isolierenden Stoff um ein Isoflavon handelt oder nicht. Verwechslungsmöglichkeiten waren vor allem gegeben mit Flavonen und Flavanonen. Der Prototyp des Isoflavons, aus dem sich alle bisher bekannten Isoflavone durch Substitution von Wasserstoffatomen am Kern oder Seitenphenyl entwickeln lassen, unterscheidet sich vom Flavontyp nur durch die Stellung des Seitenphenyls am C-Atom 3 statt am C-Atom 2.



Flavon



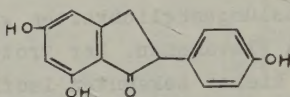
Isoflavon

Bei dieser Strukturähnlichkeit konnte von vornherein nicht damit gerechnet werden, daß einfache Reaktionen eine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen den beiden Typen erlaubten. Da Isoflavone zum Studium solcher Reaktionen nicht zur Verfügung standen, war die Isolierung aus Pflanzenmaterial von bekanntem Isoflavongehalt erforderlich. Das Genistein sollte aus *Genista tinctoria* L. gewonnen werden.

1. Isolierung von Genistein aus Genista tinctoria L.

a) Bisherige Arbeiten

Die Geschichte der Isoflavone begann, als A. G. PERKIN und P. G. NEWBURY¹²⁾ im Jahre 1899 die Isolierung von Genistein aus dem Färberginster *Genista tinctoria* L. beschrieben. Als Ergebnis ihrer Untersuchungen und der von A. G. PERKIN und L. H. HORSFALL¹³⁾ schrieben sie dem Genistein nachstehende Formel zu.



H. FINNEMORE¹⁴⁾, dem zehn Jahre später die Isolierung eines Glykosids Prunetrin aus der Rinde einer Prunusart gelang, vermutete als erster die Struktur eines 3-Phenyl-benzo-4-pyrone statt der für Flavone typischen 2-Phenyl-benzo-4-pyrone-Struktur. Aber erst 1925 konnten W. BAKER und R. ROBINSON¹⁵⁾ durch die erfolgreiche Synthese eines 5-Hydroxy-7-4'-dimethoxy-C-methyl-isoflavone und den Vergleich mit dem Methylprodukt des isolierten Genisteins beweisen, daß die 3-Phenyl-benzo-4-pyrone-Struktur in der Natur vorkommt. Der Name Isoflavon für diesen Verbindungstyp wurde von R. ROBINSON eingeführt.

b) Eigene Isolierungsmethoden

Der Methanolextrakt der frischen, zerkleinerten Pflanze zeigte im Chromatogrammbild zwei Substanzen A und B mit den R_F -Werten 0,90 und 0,92. Literaturangaben¹⁶⁾ zufolge enthält *Genista*

12) A.G.PERKIN u. P.G.NEWBURY, J.chem.Soc.(London) 75, 830 (1899)

13) A.G.PERKIN u. L.H.HORSFELL, J.chem.Soc.(London) 77, 1310 (1900)

14) H.FINNEMORE, Pharmac.J. 31, 604 (1910)

15) W.BAKER u. R.ROBINSON, J.chem.Soc.(London) 127, 1981 (1925)

16) G.KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse", Wien 1932, Bd.III/2, S. 891

tinctoria L. Genistein und Luteolin. Nach den R_f -Werten und dem Verhalten unter der Analysenquarzlampe sowie gegenüber verschiedenen Sprühreagenzien mußte es sich bei den Stoffen A und B um diese schon beschriebenen Substanzen handeln. Die Trennung und Isolierung nach dem von G. KLEIN¹⁷⁾ angegebenen Verfahren, sowie auf dem Weg der präparativen Papierchromatographie brachten keine befriedigenden Ergebnisse.

Die Isolierung durch Chromatographie an Polyamid zeigte sich den bisher angewendeten Verfahren überlegen, da sie zu einem sehr reinen, kristallinen Endprodukt führte. Im Ausschüttelungsverfahren gelang eine Abtrennung und Anreicherung der Stoffe A und B in der ätherischen Phase. Der Trockenrückstand wurde mit Methanol aufgenommen und mit neutraler Bleiazetatlösung versetzt. Vom ausgefallenen Luteolin wurde abfiltriert. Das Filtrat wurde auf eine Perlonsäule gegeben und mit Methanol als mobiler Phase entwickelt. Aus Fraktion 4 resultierten nach achttägigem Stehen Kristalle des Stoffes B in papierchromatographisch reiner Form. Das UV-Spektrum stimmte mit den in der Literatur¹⁸⁾ für Genistein angegebenen Werten überein.

Ein Vergleich des isolierten Stoffes B mit authentischem Genistein ergab ein übereinstimmendes Bild in den R_f -Werten in verschiedenen Systemen, in Farbreaktionen mit Sprühreagenzien, im Tageslicht und unter der Analysenquarzlampe, im Schmelzpunkt und UV-Spektrum und bewies damit die Identität des Stoffes B mit Genistein.

2. Untersuchung einer Genistein-Farbreaktion

Besonders wertvoll für die frühe Erkennung der Anwesenheit von genisteinartigen Substanzen im Untersuchungsmaterial erwies sich eine Beobachtung, die wir zuerst bei der Isolierung von Genistein aus Genista tinctoria L. machten. Der Genisteinfleck

17) G. KLEIN, "Handbuch der Pflanzenanalyse", Wien 1932, Bd. III/2, S. 891

18) W. BAKER, J. CHADDERTON, J.B. HARBORNE u. W.D. OLLIS, J.chem. Soc.(London) 1852 (1953)

nahm auf dem unbesprühten Chromatogramm im Laufe eines Tages eine bleibende zartrosa Färbung an. Diese Färbung war nur im Tageslicht festzustellen. Ammoniakdämpfe begünstigten die Entstehung der Färbung. Unter der Analysenquarzlampe blieb der Genisteinfleck auch unter Ammoniakwirkung dunkel.

Ähnliche Farbreaktionen auf dem unbesprühten Chromatogramm zeigte authentisches Genistein natürlicher und synthetischer Herkunft¹⁹⁾.

Für den weiteren Untersuchungsang erschien es wertvoll festzustellen, worauf das Auftreten dieser Färbung zurückzuführen und ob es spezifisch für Isoflavone im allgemeinen war.

a) Frühere Beobachtungen

G. S. POPE und W. G. WRIGHT²⁰⁾ beobachteten bei der Isolierung von Biochanin A aus *Trifolium pratense* L., daß Lösungen dieses Isoflavons mit Eisen-III-chlorid einen rötlichen Farbton lieferten. Dieser Farbton blieb nur bestehen, solange das Isoflavon im Überschuß war. Bei weiterem Zusatz von Eisenchlorid schlug die Farbe nach graugrün um. Auf Zusatz von Lauge trat die rötliche, von Säure die grüne Farbe wieder auf.

b) Eigene Untersuchungen

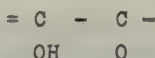
Parallelversuche mit acht anderen Isoflavonen zeigten, daß diese Farbreaktion nicht auf Genistein allein beschränkt war. Eine Übersicht über die zur Verfügung stehenden Isoflavone ergab folgendes Bild:

19) Die Testsubstanzen wurden uns freundlicherweise von den Professoren T. R. SESHADRI, Delhi/Indien und E. CHENG, Iowa/U.S.A., zur Verfügung gestellt.

20) G.S. POPE u. H.G. WRIGHT, Chem. and Ind. 1019 (1954)

Isoflavon	Struktur	Farbton
Daidzein	= 7,4'-Dihydroxy-isoflavinon	farblos
Genistein	= 5,7,4'-Trihydroxy-isoflavinon	rötlich
Orobol	= 5,7,3',4'-Tetrahydroxy-isoflavinon	rötlich
Formononetin	= 7-Hydroxy-4'-methoxy-isoflavinon	farblos
Pseudo-Baptigenin	= 7-Hydroxy-3',4'-methylenedioxy-isoflavinon	farblos
Prunetin	= 5,4'-Dihydroxy-7-methoxy-isoflavinon	rötlich
Biochanin A	= 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-isoflavinon	rötlich
Muningin	= 6,4'-Dihydroxy-5,7-Dimethoxy-isoflavinon	farblos
Irigenin	= 5,7,3'-Trihydroxy-6,4',5'-tri-methoxy-isoflavinon	rötlich

Wie der Tabelle zu entnehmen ist, haben alle positiv reagierenden Isoflavone eine freie Hydroxylgruppe am C₅. Keine Reaktion zeigen die Isoflavone mit freiem C₅ oder solche, deren Hydroxylgruppe an diesem Platz durch eine Methoxygruppierung blockiert ist. Diese Gruppe ist also mit großer Wahrscheinlichkeit an der Reaktion beteiligt. Die Gruppierung



ist in besonderem Maße zur Komplexbildung befähigt. Da sich die Reaktion auf dem unbesprühten Chromatogramm vollzieht, kann nur der Gehalt des benützten Papiers an Komplexbildnern dafür verantwortlich gemacht werden. Benützt wurde die Papiersorte Nr. 2043b Gl. der Firma C. Schleicher und Schüll. Es handelt sich dabei um ungewaschenes Papier, das nach Angaben der Herstellerfirma mindestens 1 - 2 mg Eisen pro 100 g enthält.

Im Kontrollversuch chromatographierten wir die gleichen Isoflavonlösungen auf gewaschenem Papier, das nach Angaben der Hersteller keine erfaßbaren Mengen Eisen mehr enthält. Der rötliche Farbton trat auch nach Ammoniakewirkung bei keinem Isoflavon auf. Durch Besprühen dieser Chromatogramme mit 2%iger methanolischer Eisen-III-chloridlösung erhielten wir bei ein-

zelnen Isoflavonen schwachgraue bis dunkelgrüne Färbungen. Mit einer sehr stark verdünnten Eisen-III-chloridlösung (0,05%) gelang die Reproduktion der rötlichen Stellen bei den Isoflavonen, die auch auf ungewaschenem Papier diese Reaktion gezeigt hatten. Isoflavone mit freiem C₅ bzw. mit einer C₅-Methoxygruppierung gaben keine Reaktion.

Es kann somit als erwiesen gelten, daß es sich beim Auftreten des rötlichen Farbtons auf dem unbesprühten Isoflavonchromatogramm um einen Isoflavon-Eisenkomplex handelt, wobei der Komplexbildner Eisen aus dem verwendeten Papier stammt.

Da für die Komplexbildung ein Überschuß an Isoflavon erforderlich ist, genügen beim papierchromatographischen Arbeiten die Eisenspuren des ungewaschenen Papiers zur Komplexbildung umso mehr, als im allgemeinen auch nur Gammamengen an Isoflavon für die Reaktion zur Verfügung stehen. D. H. CURNOW²¹⁾ war bei der Ausarbeitung eines verbesserten Isolierungsverfahrens von Genistein aus *Trifolium subterraneum* L. die papierchromatographische Markierung dieses Isoflavons ebenfalls nur durch sehr verdünnte Eisen-III-chloridlösungen gelungen.

3. Papierchromatographie der Isoflavone

a) Laufhöhen

Ein Überblick über die Laufhöhen verschiedener Isoflavone macht deutlich, daß trotz der relativ geringfügigen Strukturunterschiede zwischen Flavonen und Isoflavonen ein beachtlich hoher R_F-Unterschied besonders im System Isopropanol-Ameisensäure-Wasser auftritt.

21) D.H. CURNOW, Biochem.J. 58, 283 (1954)

T a b e l l e 1

Isoflavon	Substitutionstyp	R _f -Werte	
		BEW	IAW
Daidzein	dihydroxy-	0,91	0,70
Genistein	trihydroxy-	0,87	0,66
Orobol	tetrahydroxy-	0,80	0,60
Formononetin	hydroxy-methoxy	0,91	0,80
Pseudo-Baptigenin	hydroxy-methylendioxy-	0,93	0,75
Prunetin	dihydroxy-methoxy-	0,94	0,77
Biochanin A	dihydroxy-methoxy-	0,94	0,77
Muningin	dihydroxy-dimethoxy-	0,77	0,80
Irigenin	trihydroxy-trimethoxy	0,87	0,86
Aglykon Lup. A ₁		0,87	0,66

Die Größenordnung der R_f-Differenzen, um die sich die Isomere des 2-Phenyl-benzopyron-Typs vom 3-Phenyl-benzopyron-Typ unterscheiden, läßt ein Vergleich zweier Flavone, Apigenin und Luteolin, mit ihren isomeren Isoflavonen Genistein und Orobol erkennen.

T a b e l l e 2

Flavonoid	Substitutionstyp	R _f -Wert IAW	R _f -Diffe- renz
Apigenin	trihydroxy-flavon	0,52	
Genistein	trihydroxy-isoflavon	0,66	0,14
Luteolin	tetrahydroxy-flavon	0,40	
Orobol	tetrahydroxy-isoflavon	0,60	0,20

b) Farbreaktionen

Die Formelbilder der hier untersuchten Isoflavone sind in Abbildung 1 auf Seite 11 wiedergegeben.

zelnen Isoflavonen schwachgraue bis dunkelgrüne Färbungen. Mit einer sehr stark verdünnten Eisen-III-chloridlösung (0,05%) gelang die Reproduktion der rötlichen Stellen bei den Isoflavonen, die auch auf ungewaschenem Papier diese Reaktion gezeigt hatten. Isoflavone mit freiem C₅ bzw. mit einer C₅-Methoxygruppierung gaben keine Reaktion.

Es kann somit als erwiesen gelten, daß es sich beim Auftreten des rötlichen Farbtons auf dem unbesprühten Isoflavonchromatogramm um einen Isoflavon-Eisenkomplex handelt, wobei der Komplexbildner Eisen aus dem verwendeten Papier stammt.

Da für die Komplexbildung ein Überschuß an Isoflavon erforderlich ist, genügen beim papierchromatographischen Arbeiten die Eisenspuren des ungewaschenen Papiers zur Komplexbildung umso mehr, als im allgemeinen auch nur Gammamengen an Isoflavon für die Reaktion zur Verfügung stehen. D. H. CURNOW²¹⁾ war bei der Ausarbeitung eines verbesserten Isolierungsverfahrens von Genistein aus *Trifolium subterraneum* L. die papierchromatographische Markierung dieses Isoflavons ebenfalls nur durch sehr verdünnte Eisen-III-chloridlösungen gelungen.

3. Papierchromatographie der Isoflavone

a) Laufhöhen

Ein Überblick über die Laufhöhen verschiedener Isoflavone macht deutlich, daß trotz der relativ geringfügigen Strukturunterschiede zwischen Flavonen und Isoflavonen ein beachtlich hoher R_F-Unterschied besonders im System Isopropanol-Ameisensäure-Wasser auftritt.

21) D.H. CURNOW, Biochem.J. 58, 283 (1954)

T a b e l l e 1

Isoflavon	Substitutionstyp	R _f -Werte	
		BEW	IAW
Daidzein	dihydroxy-	0,91	0,70
Genistein	trihydroxy-	0,87	0,66
Orobol	tetrahydroxy-	0,80	0,60
Formononetin	hydroxy-methoxy	0,91	0,80
Pseudo-Baptigenin	hydroxy-methylendioxy-	0,93	0,75
Prunetin	dihydroxy-methoxy-	0,94	0,77
Biochanin A	dihydroxy-methoxy-	0,94	0,77
Muningin	dihydroxy-dimethoxy-	0,77	0,80
Irigenin	trihydroxy-trimethoxy	0,87	0,86
Aglykon Lup. A ₁		0,87	0,66

Die Größenordnung der R_f-Differenzen, um die sich die Isomere des 2-Phenyl-benzopyron-Typs vom 3-Phenyl-benzopyron-Typ unterscheiden, läßt ein Vergleich zweier Flavone, Apigenin und Luteolin, mit ihren isomeren Isoflavonen Genistein und Orobol erkennen.

T a b e l l e 2

Flavonoid	Substitutionstyp	R _f -Wert IAW	R _f -Diffe- renz
Apigenin	trihydroxy-flavon	0,52	
Genistein	trihydroxy-isoflavon	0,66	0,14
Luteolin	tetrahydroxy-flavon	0,40	
Orobol	tetrahydroxy-isoflavon	0,60	0,20

b) Farbreaktionen

Die Formelbilder der hier untersuchten Isoflavone sind in Abbildung 1 auf Seite 11 wiedergegeben.

Das Verhalten gegenüber verschiedenen Sprühreagenzien ist in Tabelle 3 dargestellt:

T a b e l l e 3

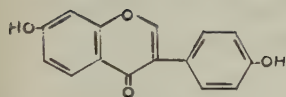
Isoflavon	T.	UV	(NH ₄) ⁺	Fe ⁺⁺⁺	Al ⁺⁺⁺	Pb ⁺⁺⁺	Mg ⁺⁺
Daidzein	-	-	B	-			
Genistein	R	D	D	V	s.Gr	s.G	s.B
Orobol	R	D	D	V			
Formononetin	-	-	B	-	s.G		
Pseudo-Baptigenin	-	-	B	-			
Prunetin	R	D	D	V			
Biochanin A	R	D	D	V	s.Gr	G	
Muningin	-	-	-	-	-	-	B
Irigenin	R	D	D	V	D	D	
Aglykon Lup.A ₁	R	D	D	V	s.Gr	s.G	s.B

Erläuterungen: T = Tageslicht UV = Ultraviolettes Licht
 B = blau Gr = grün
 D = dunkel R = rötlich
 G = gelb V = violett bis schwarz
 s. = schwach

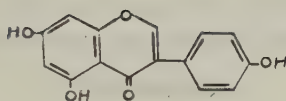
Die Isoflavone Genistein, Orobol, Prunetin, Biochanin A und Irigenin reagieren mit allen verwendeten Reagenzien. Diese Gruppe von Isoflavonen, die auch das aus *Lupinus polyphyllus* Lindl. gewonnene Aglykon A₁ umfaßt, unterscheidet sich von den übrigen Isoflavonen dieser Untersuchungsreihe durch eine freie Hydroxylgruppe am C₅. Daidzein, Formononetin und Pseudo-Baptigenin nehmen unter Einwirkung von Ammoniakdämpfen eine hellblaue Fluoreszenz unter der Analysenquarzlampe an. Muningin, dessen Hydroxylgruppe am C₅ durch eine Methoxygruppierung blockiert ist, zeigt auch gegenüber Ammoniak keine Reaktion.

Die Bereitschaft zur Farbkomplexbildung der Isoflavone nimmt demzufolge von den 5-Hydroxy-Verbindungen über die am nicht substituierten Isoflavone zum 5-Methoxy-Typ hin ab.

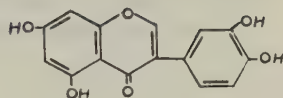
Abbildung 1



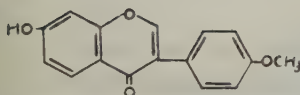
Daidzein



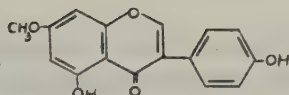
Genistein



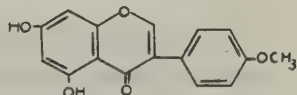
Orobol



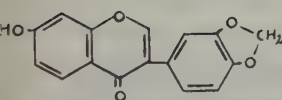
Formononetin



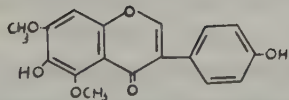
Prunetin



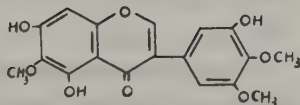
Biochanin A



Pseudo-Baptigenin



Muningin



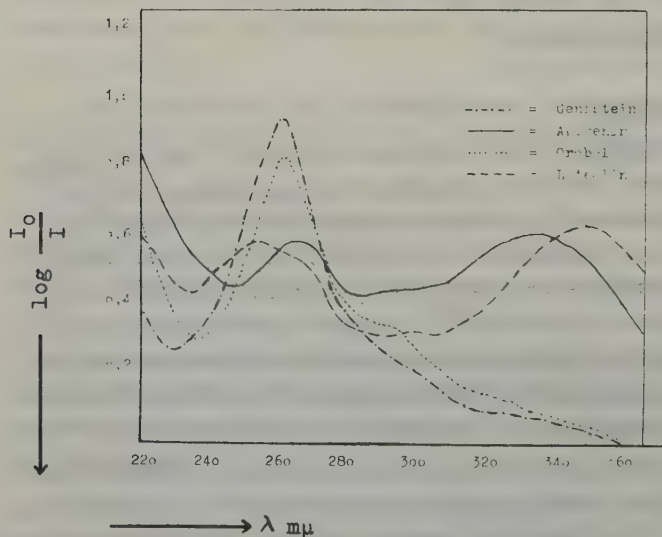
Irogenin

stitutionen beträchtlich variieren kann, lässt also nicht ohne weiteres erkennen, ob es sich um ein 2- oder 3-Phenyl-benzopyron handelt. Eine hinreichende Unterscheidungsmöglichkeit dieser Verbindungen von Isoflavonen bietet jedoch die Intensität l ngerwelliger Bande.

Wir verglichen die UV-Spektren der Isoflavone Genistein und Orobol mit den Spektren der Flavone Apigenin und Luteolin, die die gleichen Substitutionsverhältnisse aufweisen wie die beiden Isoflavone.

	max _{mμ} II	log. ϵ	max _{mμ} I	log. ϵ
Genistein	263	4,50	325	-
Apigenin	265	4,25	340	4,31
Orobol	263	4,17	295	-
Luteolin	258	4,22	355	4,28

Abbildung 4



Die Isoflavone zeigen im Bereich zwischen 320 und 360 mμ kein ausgeprägtes Maximum mehr. Die Absorption in diesem Bereich ist so schwach, daß es nur mehr zur Ausbildung einer Inflexion kommt. Einen Überblick über die Lage der Maxima der UV-Spektren von neun Isoflavonen gibt Tabelle 4.

T a b e l l e 4

Isoflavon	min. mμ	max. mμ	Inflexion mμ
Daidzein	-	250	305
Genistein	231	263	325
Orobol	238	263	295
Formononetin	- -	250	300
Pseudo-Baptigenin	240	250	295
Prunetin	231	262	325
Biochanin A	231	262	325
Muningin	235	265	330
Irigenin	240	267	-
Lup.A ₁ Aglykon	231	263	325

b) Spektrenverschiebungen

Untersuchungen über die Veränderungen der UV-Spektren unter dem Einfluß von Natriumazetat bzw. nach Darstellung von Metallkomplexen, wie sie von verschiedenen Autoren²³⁾²⁴⁾²⁵⁾ an Flavonen, Flavonolen und Flavanonen beschrieben worden sind, fehlten bisher auf dem Gebiet der Isoflavone.

Wir studierten daher die UV-Spektren von sieben Isoflavonen im Natriumazetatmilieu sowie nach Zusatz von wasserfreiem Aluminiumchlorid.

Das Verhalten der beiden Isoflavone Biochanin A^{*)} und Muningin^{**)} im ultravioletten Bereich ist in den Abbildungen 5 und 6 (S. 16) dargestellt.

23) J.B.HARBORNE, Chem. and Ind. 1142 (1954)

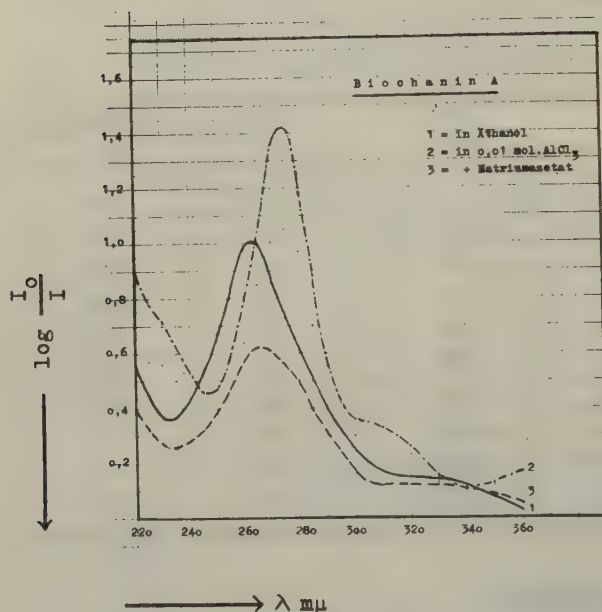
24) T.SWAIN, Chem. and Ind. 1480 (1954)

25) L.JURD u. T.A.GEISSMAN, J.org.Chemistry 21, 1395 (1956)

*) Biochanin A = 5,7-Dihydroxy-4'-methoxy-isoflavin

**) Muningin = 6,4'-Dihydroxy-5,7-dimethoxy-isoflavin

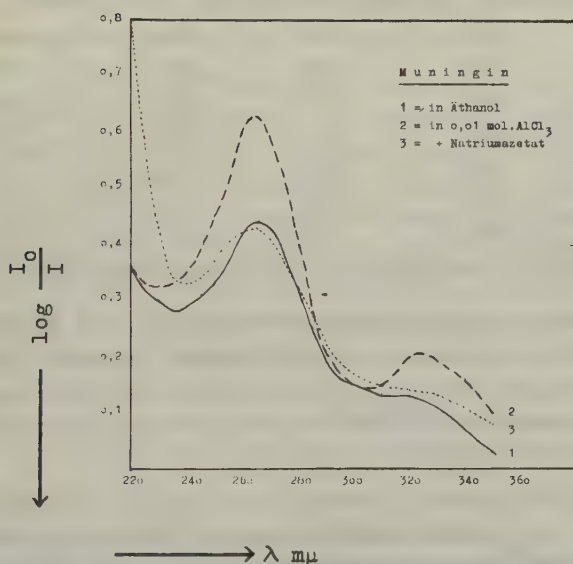
Abbildung 5



Im Falle des Biochanin A findet sowohl mit Natriumazetat als auch mit Aluminiumchlorid eine bathochrome Verschiebung des Maximums um 10 bis 12 mμ statt, die auf eine Chelatbildung mit der Carbonylgruppe und der benachbarten Hydroxylgruppe am C₅ zurückzuführen ist.

Muningin zeigt weder mit Natriumazetat noch mit Aluminiumchlorid eine Verschiebung. Obwohl das Isoflavon vier Substituenten trägt, bietet sich keine Möglichkeit einer Chelatbildung und damit einer Verschiebung der Maxima.

Abbildung 6



Die Hydroxylgruppe am C_5 ist durch Methoxylierung blockiert. Weder die freie Hydroxylgruppe am C_6 noch die am C_4 , sind demnach befähigt, mit dem Karbonylsauerstoff und dem zugesetzten Aluminiumchlorid ein Metallchelate auszubilden.

Die hier untersuchten Isoflavone lassen sich unter diesem Gesichtspunkt in zwei Gruppen einteilen:

- 1) Genistein, Biochanin A, Iridin und Orobol mit einer freien C_5 -Hydroxylgruppe.
- 2) Daidzein und Formononetin mit nicht substituiertem C_5 sowie Munisingin mit einer Methoxylgruppe am C_5 .

Die Verschiebungen der Maxima dieser Isoflavone zeigt Tabelle 5.

T a b e l l e 5

Isoflavon	Äthanol mμ	Na.-Azet. mμ	AlCl ₃ mμ ³	Verschiebung	
				Na ⁺	Al ⁺⁺⁺
Genistein	262	272	276	+10	+14
Biochanin A	262	267	275	+ 5	+13
Irigenin	267	276	278	+ 9	+11
Orobol	263	274	275	+11	+12
Daidzein	250	257	242	+ 7	- 8
Formononetin	250	250	250	± 0	± 0
Muningin	265	265	265	± 0	± 0

Die hypsochrome Verschiebung des UV-Spektrums von Daidzein unter Einwirkung von Aluminiumchlorid ist darauf zurückzuführen, daß eine Metallkomplexbildung mit diesem Isoflavon nicht möglich ist und nur die schwach saure Reaktion des Aluminiumchlorids zur Auswirkung kommt.

Es kann somit festgestellt werden, daß die von L. JURD und T. A. GEISSMAN²⁶⁾ an verschiedenen Flavontypen sowie die von T. SWAIN²⁷⁾ und L. JURD²⁶⁾ für Flavonaglykone gefundenen Gesetzmäßigkeiten auch auf Isoflavone ausgedehnt werden können.

Da mit Ausnahme von Genistin, das sich zwanglos in dieses Schema einfügt, keine weiteren Isoflavonglykoside zur Verfügung standen, mußten die Arbeiten auf die Aglykone beschränkt bleiben.

2. IR-Spektroskopie

Während die Absorption zahlreicher Flavone im infraroten Wellenbereich in jüngster Zeit²⁸⁾ eingehend untersucht wurde, war über die Infrarotspektroskopie der Isoflavone bisher wenig bekannt. W. K. WARBURTON²⁹⁾, der einen erschöpfenden Überblick über die bis zum Jahre 1954 bekannten Isoflavone gibt, behandelt wohl

26) L. JURD u. T.A. GEISSMAN, J.org.Chemistry 21, 1395 (1956)

27) T. SWAIN, Chem. and Ind. 1480 (1954)

28) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. F. GLOGGENIESSER, Arch.Pharmaz. Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 291/63, 126 (1958)

29) W.K. WARBURTON, Quart.Rev. 8, 67 (1954)

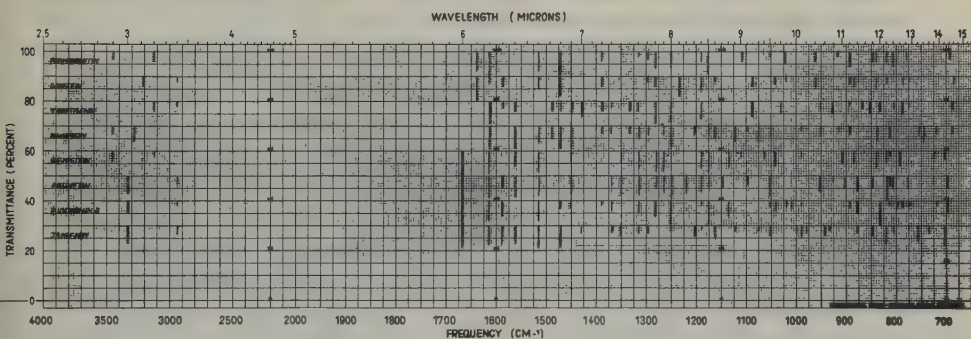
in ausführlicher Weise die UV-Spektren dieser Isoflavone, läßt aber die Absorption im infraroten Bereich noch unerwähnt.

Wir untersuchten das Verhalten von neun Isoflavonen mit bekannter Struktur im infraroten Bereich.

Die IR-Spektren dieser Isoflavone sind in den Abbildungen im Anhang wiedergegeben. Um eventuelle Gesetzmäßigkeiten, bzw. gemeinsame Banden zu erkennen, faßten wir die Spektren in einem Strichdiagramm zusammen. Die Intensität der Bande wird durch die Länge des Strichs ausgedrückt, wobei eine Teilstrichlänge einer Absorption von 10% entspricht. Für die Übersicht wurde die Einteilung nach Wellenzahlen bevorzugt, da sich hierbei der Bereich, in dem die Carbonylbande liegt, zwischen 1600 cm^{-1} und 1800 cm^{-1} am besten darstellen läßt.

Abbildung 7

Strichdiagramm der IR-Spektren von neun Isoflavonen



Aus diesem Strichdiagramm lassen sich zwei Gruppen erkennen, die sich prinzipiell in der Lage der C=O Valenzschwingungsbande unterscheiden:

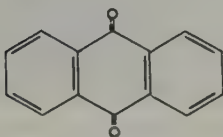
- α) Die erste Gruppe der im Strichdiagramm verglichenen Isoflavone umfaßt die Verbindungen Formononetin, Daidzein, Pseudo-Baptigenin und Muningin. Die Carbonylbande liegt

liegt bei diesen Isoflavonen zwischen 1639 cm^{-1} und 1613 cm^{-1} (s. Abb. 18 bis 26, S. 60 ff).

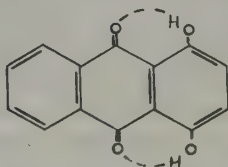
β) Bei den restlichen Verbindungen tritt die Carbonylbande sehr lagekonstant bei 1667 cm^{-1} auf.

Aus einem Strukturvergleich der einzelnen Verbindungen dieser beiden Gruppen läßt sich folgendes erkennen^{*)}:

Sämtliche Verbindungen der Gruppe β) haben am C-Atom 5 eine freie Hydroxylgruppe. Bei den Isoflavonen der ersten Gruppe fehlt diese Hydroxylgruppe, oder sie ist durch Ätherbildung blockiert. Da die Lage der C=O Valenzschwingungsbande von der elektropositiven und elektronegativen Ladung benachbarter Gruppen abhängt, ist zu erwarten, daß die Lage dieser Bande durch eine benachbarte OH-Gruppe beeinflusst wird. Wie das Strichdiagramm zeigt, liegt die C=O Valenzschwingungsbande bei der ersten Gruppe im längerwelligen Bereich. Die Carbonylbanden der zweiten Gruppe, deren benachbarte Hydroxylgruppen eine Schwächung ihrer Doppelbindungen erwarten ließen, treten dagegen im kürzeren Bereich um 1667 cm^{-1} auf. Nach den Erfahrungen an dem ähnlich gebauten Verbindungstyp der Hydroxychinone³⁰⁾ wäre der umgekehrte Effekt, nämlich Rotverschiebung der C=O Valenzschwingung durch Wasserstoffbrückenbindung zu erwarten. So liegt zum Beispiel die C=O Bande beim Anthrachinon bei 1684 cm^{-1} , beim 1,4-Dihydroxyanthrachinon bei 1613 cm^{-1} .³¹⁾³²⁾



Anthrachinon



1,4-Dihydroxyanthrachinon

30) M.L.JOSIEN, N.FUSON, J.M.LEBAS u. T.M.GREGORY, J.chem. Physics 21, 331 (1953)

31) M.St.C.FLETT, J.chem.Soc.(London) 71, 1073 (1949)

32) D.HADZI u. N.SHEPPARD, Trans.Faraday Soc. 50, 911 (1954)

*) Herrn Dr. BIECKERT, Max-Planck-Institut für Physiologie, München, danken wir für die Aufnahme der IR-Spektren und wertvolle Hinweise bei deren Diskussion.

Daß sich diese Verhältnisse nicht kritiklos auf das Gebiet der Flavone übertragen lassen, konnte an Hand der Untersuchungen an 3-Hydroxy-, 5-Hydroxy- und 3,5-Dihydroxyflavonen gezeigt werden³³⁾.

Das unterschiedliche Verhalten von Flavon und Isoflavon zeigt besonders deutlich die Betrachtung der 5-Hydroxyverbindungen. Die C=O Valenzschwingungsbande aller 5-Hydroxyisoflavone liegt bei 1667 cm^{-1} . L. HÖRHAMMER und Mitarbeiter³³⁾ fanden bei 3,5-Dihydroxy-flavonen die Carbonylbanden stets bei dieser Frequenz. Die Isoflavone, die keine 5-OH-Gruppe tragen und eigentlich bei kürzeren Wellenlängen absorbieren müßten, da keine Möglichkeit einer Wasserstoffbrückenbindung und damit Schwächung der Carbonylbande besteht, zeigen diese Bande zwischen 1613 cm^{-1} und 1639 cm^{-1} . Sie liegt somit in dem Bereich, in dem die C=O Gruppe von 3-Hydroxy-flavonen absorbiert.

Es läßt sich also ein analoges Verhalten von 3-Hydroxyflavonen und am C₅ nicht substituierten Isoflavonen auf der einen Seite sowie von 3,5-Dihydroxy-flavonen und 5-Hydroxy-isoflavonen auf der anderen Seite feststellen.

Neben den Unterschieden in der Lage der C=O Valenzschwingungsbande fällt bei der Betrachtung des Strichdiagramms weiter auf, daß

- α) die OH Valenzschwingungsbanden der Verbindungen der zweiten Gruppe schärfer sind und kürzerwellig liegen (3390 cm^{-1}) als die der ersten vier Isoflavone,
- β) im Bereich zwischen 675 cm^{-1} und 725 cm^{-1} zwei entsprechende Bandengruppen zu erkennen sind und
- γ) fünf der untersuchten Isoflavone eine stark ausgeprägte Bande um 1040 cm^{-1} bis 1050 cm^{-1} aufweisen. Es sind dies Prunetin, Genistein, Biochanin A, Formononetin und Orobol.

Andeutungsweise lassen diese Bande auch Daidzein und Pseudo-Baptigenin erkennen.

Bei Muningin und Irogenin fehlt sie ganz. Diese beiden Isoflavone unterscheiden sich vor allem dadurch von den übrigen un-

33) L.HÖRHAMMER, W.WAGNER u. F.GLOGGENGIESER, Arch.Pharmaz.Ber. dtsh.pharmaz.Ges. 291/63, 126 (1958)

tersuchten Verbindungen, daß sie zwei bzw. drei Methoxygruppen tragen, deren Einfluß möglicherweise das Auftreten dieser Bande (z.B. Orobol) stark zurückdrängt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden:

- 1) Der Bereich der Carbonylbande läßt mit Sicherheit erkennen, ob am C_5 eine freie Hydroxylgruppe vorliegt.

Bei freiem C_5 , wie beim Formononetin, Daidzein und Pseudo-Baptigenin, liegt die Carbonylvalenzschwingungsbande zwischen 1620 cm^{-1} und 1640 cm^{-1} .

Muningin mit einer Methoxygruppe am C_5 verhält sich genau so wie die Isoflavone mit freiem C_5 .

Die Carbonylvalenzschwingungsbanden der 5-Hydroxy-isoflavone Genistein, Prunetin, Biochanin A, Iridenin und Orobol liegen mit bemerkenswerter Konstanz bei 1667 cm^{-1} .

- 2) Eine Unterscheidung von Isoflavonglykosiden und Aglykonen auf Grund der starken C-O Valenzschwingungsbanden der Glykoside im Bereich zwischen 1000 cm^{-1} und 1100 cm^{-1} ist ohne weiteres möglich.

III. PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG EINHEIMISCHER

FUTTERLEGUMINOSEN

Die bei der Isolierung von Genistein beobachtete und auf Seite 6 näher beschriebene Farbreaktion ermöglichte im Untersuchungsmaterial die frühzeitige Erkennung von Verbindungen mit 5-Hydroxy-isoflavonstruktur. Andere Isoflavontypen waren damit nicht zu erfassen.

Nach Arbeiten von D. G. WENZEL und P. ROSENBERG³⁴⁾ sind alle bisher als oestrogen erkannten Isoflavone durch eine Hydroxylgruppe am C_5 ausgezeichnet. Da die vorliegenden Untersu-

34) D.G.WENZEL u. P.ROSENBERG, J.Amer.pharmac.Assoc.,sci.Edit.
No. 6 (1956)

chungen an einheimischen Futterleguminosen auf Isoflavone in erster Linie im Hinblick auf oestrogene Aktivität in Angriff genommen worden waren, konnten andere Isoflavontypen im Rahmen der Übersicht außer acht gelassen werden.

Der pharmakologische Test auf oestrogene Aktivität einiger weiterer Isoflavone durch E. CHENG und Mitarbeiter³⁵⁾ hat allerdings gezeigt, daß außer 5-Hydroxy-isoflavonen ein weiteres Isoflavon, nämlich Daidzein, ein 7,4'-Dihydroxy-isoflavon, eine oestrogene Aktivität erreicht, die die Wirkung von Biochanin A oder Genistein, zwei 5-Hydroxy-isoflavonen, sogar übertrifft.

Zwanzig Papilionaceen-Arten, insbesondere solche, die als Futterpflanzen von Bedeutung sind, wurden folgendermaßen zur Untersuchung vorbereitet:

Das getrocknete Pflanzenmaterial extrahierten wir erschöpfend im Soxhlet mit Methanol. Eine getrennte Untersuchung einzelner Pflanzenteile erschien im Hinblick auf den Untersuchungszweck unnötig. Nach dem Abdampfen des Methanols nahmen wir den Extrakt mehrmals mit heißem Wasser auf. Ausgangslösungen für die papierchromatographische Untersuchung bildeten der Methanol-extrakt, der wässerige Extrakt und gegebenenfalls die ätherische und essigätherische Ausschüttelung des wässerigen Extrakts. Das Ergebnis dieses chromatographischen Überblicks zeigt

T a b e l l e 6

Pflanze	Herkunft	Genistein
Anthyllis vulneraria L.	Botan.Gart.Mchn.	-
Coronilla varia L.	Fürstenfeldbruck	-
Hedysarum alpinum Jacq.	Pordoi/Dolomiten	-
Lotus corniculatus L.	Botan.Gart.Mchn.	-
Lotus tetragonolobus L.	Botan.Gart.Mchn.	-
Lupinus angustifolius L.	Botan.Gart.Mchn.	-

35) E.CHENG, L.YODER, G.D.STORY u. W.BURROUGHS, Science 120, 575 (1954)

Fortsetzung Tabelle 6:

Pflanze	Herkunft	Genistein*
<i>Lupinus polyphyllus</i> Lindl.	Fürstenfeldbruck	+++
<i>Medicago falcata</i> L.	Botan.Gart.Mchn.	-
<i>Medicago lupulina</i> L.	Segendorf	-
<i>Medicago sativa</i> L.	Leitenbach	-
<i>Ononis spinosa</i> L.	Mainburg	-
<i>Pisum sativum</i> L.	Fürstenfeldbruck	-
<i>Trifolium badium</i> Schreb.	Alpstein/Schweiz	-
<i>Trifolium campestre</i> Schreb.	Fürstenfeldbruck	++
<i>Trifolium hybridum</i> L.	Segendorf	-
<i>Trifolium pannonicum</i> L.	Botan.Gart.Mchn.	-
<i>Trifolium pratense</i> L.	Botan.Gart.Mchn.	+++
<i>Trifolium repens</i> L.	Botan.Gart.Mchn.	-
<i>Trifolium rubens</i> L.	Botan.Gart.Mchn.	-
<i>Vicia orobus</i> D.C.	Botan.Gart.Mchn.	-

*) Das Zeichen "-" zeigt die Abwesenheit von Genistein und anderen 5-Hydroxy-isoflavonen an.

Drei der untersuchten Papilionaceen ließen sowohl nach der Färbung des unbesprühten Chromatogramms als auch nach dem Verhalten gegenüber verschiedenen Sprühreagenzien die Anwesenheit genisteinartiger Stoffe vermuten:

- 1) *Lupinus polyphyllus* Lindl.
- 2) *Trifolium campestre* Schreb.
- 3) *Trifolium pratense* L.

Aus *Trifolium pratense* hatten G. S. POPE und H. G. WRIGHT³⁶⁾ im Jahre 1954 Genistein und Formononetin isolieren können. In einer Übersicht über verschiedene australische Kleesorten fand D. H. CURNOW³⁷⁾ 1955 bei *Trifolium campestre* Schreb. eine ähnliche Reaktion wie bei der genisteinhaltigen species *Trifolium subterraneum* L. Im Rahmen einer papierchromatographischen Untersuchung

36) G.S.POPE u. H.G.WRIGHT, Chem. and Ind. 1019 (1954)

37) D.H.CURNOW u. R.C.ROSSITER, Austral.J.exp.Biol.med.Sci. 33, 243 (1955)

konnte er jedoch nicht klären, ob tatsächlich Genistein oder ein ähnliches Isoflavon vorlag.

In *Lupinus polyphyllus* Lindl. war die Anwesenheit derartiger Stoffe bisher nicht beobachtet worden. Wir wendeten uns daher zunächst der Isolierung dieser Substanz zu.

Im weiteren Teil der Arbeit sollte geklärt werden, ob der von D. H. Curnow vermutete Genisteingehalt in *Trifolium campestre* durch Isolierung und Vergleich mit authentischem Genistein bestätigt werden konnte.

IV. ISOLIERUNGEN AUS LUPINUS POLYPHYLLUS LINDL.

1. Isolierung von Lupinus-Substanz A₁

Wie die Übersichtschromatogramme von *Lupinus polyphyllus* Lindl. zeigten, ging der Hauptteil des gesuchten Stoffes in die Essigesterausschüttelung. Wir wählten daher diese Aufarbeitungsphase als Ausgangsbasis.

Aus dem frischen Pflanzenmaterial wurde durch erschöpfende Soxhletextraktion ein Methanolextrakt gewonnen. Nach der Entfernung des Chlorophylls und der fettigen Ballaststoffe in üblicher Weise wurde der wässrige Extrakt nacheinander mit Benzin, Äther und Essigester ausgeschüttelt. Die Essigesterausschüttelung chromatographierten wir in dem als Laufmittel für Glykoside besonders geeigneten System Essigester-Ameisensäure-Wasser. Sie enthielt neben der isoflavonartigen Substanz im R_F -Wert 0,74 drei weitere Substanzen mit den R_F -Werten 0,63, 0,41 und 0,29. Wir bezeichneten die Inhaltsstoffe in der Reihenfolge ihrer R_F -Werte mit Lupinus-Substanz A, B, C und D.

Da der R_F -Unterschied zwischen den Substanzen A und B genügend groß war, versuchten wir zunächst durch fraktionierte Kristallisation zum Reinstoff A zu kommen. Die Essigesterausschüttelung wurde zur Trockene eingedampft und aus Methanol mehrmals umkristallisiert. Die dabei in kristalliner Form erhaltene Substanz A zeigte

jedoch keinen scharfen Schmelzpunkt. Wir chromatographierten daher in den für die Trennung von Substanzen mit hohen R_f -Werten besonders geeigneten Laufmitteln Isopropanol-Wasser und Isopropanol-Ameisensäure-Wasser und fanden, daß keine einheitliche Substanz vorlag.

Die Substanz mit der größeren Laufhöhe in diesem System zeigte die charakteristische Farbreaktion des rötlichen Eisenkomplexes. Wir bezeichneten sie mit Lupinus-Substanz A_1 . Der tiefer sitzende Substanzfleck - im weiteren mit Lupinus-Substanz A_2 bezeichnet - gab auch nach Einwirken von Ammoniakdämpfen keine Farbreaktion.

Als geeignete Möglichkeit, die Substanzen A_1 und A_2 zu trennen, erwies sich die Polyamid-Chromatographie, die von L. HÖRHAMMER und Mitarbeitern³⁸⁾³⁹⁾ zum ersten Mal auf dem Flavongebiet angewendet und systematisch ausgearbeitet worden war.

Die Trennung der beiden Substanzen gelang über eine ca. 60 cm hohe Perlonsäule mit reinem Methanol als mobiler Phase.

Somit ergab sich für die Isolierung von Lupinus-Substanz A_1 das in Tabelle 7 festgehaltene Isolierungsschema.

T a b e l l e 7

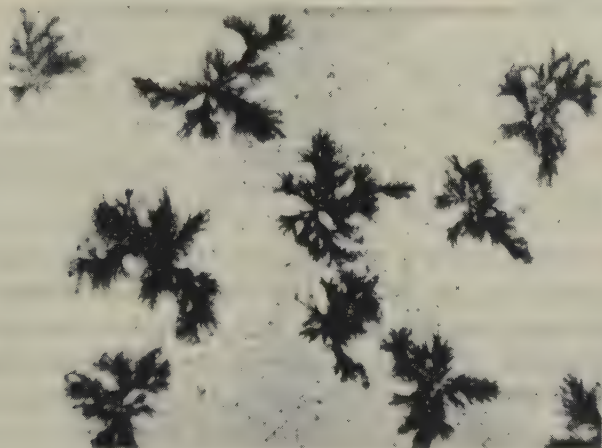
Methanolextrakt	
↓	Abtrennung des Chlorophylls
wässriger Extrakt	
↓	Abtrennung der benzin- und ätherlöslichen Begleitstoffe
Essiggesterausschüttelung	
↓	fraktionierte Kristallisation aus Methanol
Mischkristallisat A	
↓	Chromatographie an Polyamid
Reinsubstanz A_1	

38) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER, J. IZQUIERDO-SORLI u. L. ENDRES, Arch.Pharmaz.Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 291/63, 269 (1958)

39) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. W. LEEB, Naturwissenschaften 44, 513 (1957)

Das aus ca. 3 kg frischen Blättern erhaltene Mischkristallisat wurde an zwölf Polyamidsäulen aufgetrennt und lieferte insgesamt 140 mg Substanz A₁, die in farblosen Nadeln kristallisierte.

Abbildung 8



2. Strukturaufklärung von Lupinus-Substanz A₁

Arbeiten an Glykosid A₁

Die R_F -Werte 0,61^{*)}, 0,75^{**)} und 0,69^{***)} ließen auf den Glykosidcharakter der Substanz A₁ schließen. Unter der Analysenquarzlampe war die Substanz als dunkler Fleck auf dem schwach blau fluoreszierenden Papier zu erkennen. Im Tageslicht nahmen die zunächst nicht sichtbaren Flecken im Laufe von 24 Stunden eine zartrosa Färbung an.

*) System:	Butanol-Essigsäure-Wasser	(4 + 1 + 5)
**) System:	Isopropanol-Ameisensäure-Wasser	(2 + 5 + 5)
***) System:	Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser	(10 + 2 + 3)

Die Reduktion der Substanz A_1 mit Magnesium in salzsaurer Lösung zu einer orange bis zwiebelrot gefärbten Verbindung bestätigt nach R. WILLSTÄTTER und H. MALLISON⁴⁰⁾ den Flavonoidcharakter der isolierten Substanz.

Glykosid A_1 gab mit Zirkonoxychlorid⁴¹⁾ eine gelbe Fluoreszenz, die sich durch Besprühen mit Zitronensäure löschen ließ.

Der Eisen-III-chloridtest⁴²⁾, den L. H. BRIGGS und R. H. LOCKER speziell an Flavonen untersuchten, war positiv und ließ eine 3,5- oder 8-Hydroxyverbindung erwarten.

Den Schmelzpunkt der Substanz stellten wir auf der Kofler-Heizbank mit 251° C fest.

Das UV-Spektrum von Glykosid A_1 zeigt neben einem Maximum bei 262 m μ nur ein angedeutetes Maximum in Form einer Inflexion bei 325 m μ . Es läßt in seiner charakteristischen Kurve mit großer Wahrscheinlichkeit das Vorliegen einer Isoflavonstruktur erwarten.

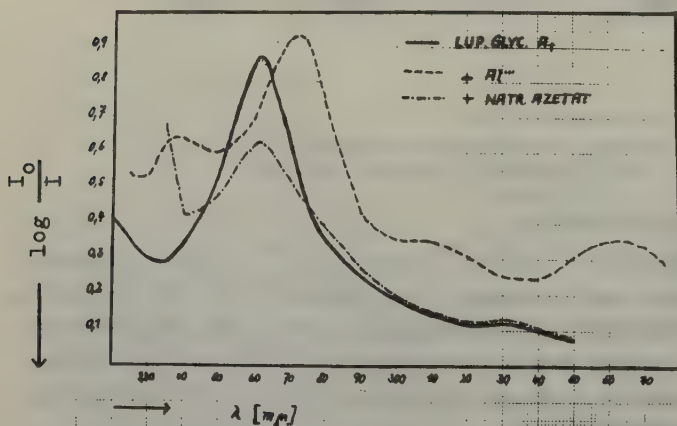


Abbildung 9

UV-Spektrum von
Lupinus-Subst. A_1

40) R. WILLSTÄTTER u. H. MALLISON, S.B. preuß. Akad. Wiss., phys.-math. Kl. 769 (1914)

41) L. HÖRHAMMER u. R. HÄNSEL, Arch. Pharmaz. Ber. dtsch. pharmaz. Ges. 284/56, 276 (1951)

42) L. H. BRIGGS u. R. H. LOCKER, J. chem. Soc. (London) 3131 (1951)

Damit aber entfällt die Möglichkeit einer OH-Substitution am C₃, da an dieser Stelle bei allen Isoflavonen das Seitenphenyl sitzt. In Übereinstimmung mit dem Eisenchloridtest bleibt somit nur mehr die Möglichkeit einer C₅- oder C₆-Hydroxysubstitution.

Mit A l u m i n i u m c h l o r i d zeigte das UV-Spektrum des Glykosids eine Verschiebung des ersten Maximums von 262 nach 273 m μ und des zweiten Maximums von 320 nach 345 m μ .

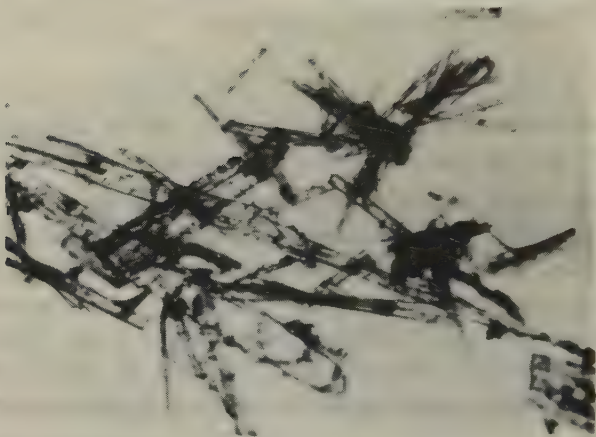
Die Ausbildung eines Aluminiumkomplexes, der nach L. JURD und T. A. GEISSMAN⁴³⁾ die Ursache dieser bathochromen Verschiebung darstellt, setzt das Vorhandensein zweier Hydroxylgruppen in o-Substitution oder einer Hydroxygruppe in Nachbarstellung zur Carbonylgruppe des Flavongerüsts voraus. Liegt keine o-Dihydroxy-Gruppierung im Molekül vor, so kann es sich im Falle der Isoflavone strukturbedingt nur um eine C₅-Hydroxy-Substitution handeln.

Die H y d r o l y s e von Glykosid A₁ gelang ohne große Schwierigkeit mit 10%iger Schwefelsäure in drei Stunden, wobei wir wegen der schlechten Wasserlöslichkeit des Glykosids einige Milliliter Methanol zusetzten.

Das Aglykon kristallisierte aus Methanol in farblosen Nadeln aus (s. Abb. 10, S. 30).

43) L.JURD u. T.A.GEISSMAN, J.org.Chemistry 21, 1395 (1956)

Abbildung 10



Die Elementarbestimmung ^{*)} von Lupinus-Substanz A₁, deren Ergebnisse einem Trihydroxy-isoflavon-monoglucosid entsprachen, ergab folgenden Zahlenwert:

Lupinus-Glykosid A₁ (C₂₁H₂₀O₁₀)_n Mol.Gew. 432

gef.: C 59,56% H 5,20%

ber.: C 58,35% H 4,63%

Die Methoxylgruppenbestimmung ^{**)} des Glykosids ergab den Wert
3,20% OCH₃.

Somit war mit dem Vorliegen einer Methoxylgruppe in Substanz A₁ nicht zu rechnen.

Die Durchführung einer Molekulargewichtsbestimmung nach K. RAST ⁴⁴⁾ scheiterte an der Unlöslichkeit von Substanz A₁ in Kampfer.

44) K.RAST, Ber.dtsch.chem.Ges. 55, 1051 u. 3727 (1922)

*) Ausgeführt vom Mikroanalytischen Laboratorium Dr.A.Schoeller, Kronach/Ofr.

**) Durchgeführt vom Mikroanalyt.Labor. A.Bernhard, Mülheim/Ruhr

Wir unterwarfen Substanz A₁ einer a l k a l i s c h e n H y d r o l y s e , wobei wir uns an die von F. E. KING, T. J. KING und A. J. WARWICK⁴⁵⁾ angegebene Methode hielten.

Im Hydrolysat konnten wir Ameisensäure nachweisen. Glykosid A₁ mußte demnach eine Isoflavonstruktur zugesprochen werden.

Eine A l k a l i s c h m e l z e mit ca. 10 mg Substanz A₁ führten wir nach einem Verfahren von E. SPÄTH und W. GRUBER⁴⁶⁾ durch. Bei einer Reaktionsdauer von zwei Minuten erhielten wir als Spaltprodukte p-Hydroxybenzoesäure, die auf papierchromatographischem Weg nachgewiesen wurde. Das erhaltene Spaltprodukt p-Hydroxybenzoesäure ließ eine 4'-Hydroxy-Substitution des Seitenphenyls von Substanz A₁ erwarten.

Identifizierung des Aglykons

Die R_F - w e r t e des Aglykons lagen mit 0,87^{*)}, 0,95^{**)} und 0,66^{***)} in dem für Aglykone charakteristischen Bereich. Der relativ hohe R_F -Wert des Aglykons A₁ im System Isopropanol-Ameisensäure-Wasser ließ ein sehr hydroxylarmes Flavon oder ein Isoflavon erwarten.

In ihren F a r b r e a k t i o n e n unterscheiden sich Aglykon A₁ und Glykosid gegenüber verschiedenen Sprühreagenzien nicht. Damit entfällt die Möglichkeit einer C₃-Verglykosidierung.

Der S c h m e l z p u n k t lag nach dem Umkristallisieren aus Methanol bei 296° C.

Die A z e t y l i e r u n g nach der üblichen Methode mit Natriumazetat und Essigsäureanhydrid führte zu einem Azetylprodukt, das nach einmaligem Umkristallisieren aus Äthanol zwischen 194° C und 196° C schmolz.

Die U V - K u r v e des Aglykons A₁ im ultravioletten Bereich ließ gegenüber dem Glykosidspektrum keine wesentlichen Abweichungen erkennen und bestätigte erneut die vermutete Isofla-

45) F.E.KING, T.J.KING u. A.J.WARWICK, J.chem.Soc.(London) 96 (1952)

46) E.SPÄTH u. W.GRUBER, Ber.dtsch.chem.Ges. 74, 1492 (1941)

*) System: Äthylazetat-Ameisensäure-Wasser

**) System: Butanol-Eisessig-Wasser

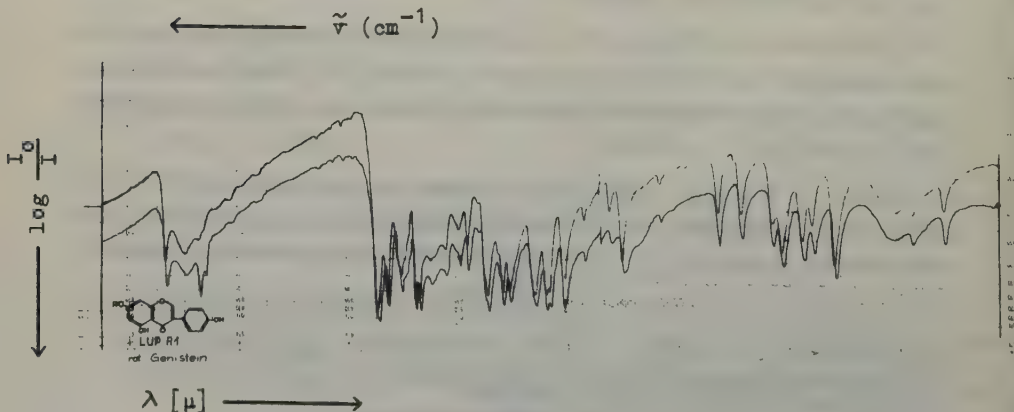
***) System: Isopropanol-Ameisensäure-Wasser

vonstruktur. Ein sehr ähnliches Spektrum zeigten die Isoflavone Prunetin, Genistein und Biochanin A.

Die Schmelzpunkte dieser Isoflavone liegen bei 236°C für Prunetin, bei 293°C für Genistein und bei 214°C für Biochanin A. Der Schmelzpunkt von Lupinus-Aglykon A_1 stimmte mit dem von Genistein überein. Wir führten deshalb einen Mischschmelzpunkt des Aglykons mit Genistein synthetischer Herkunft durch, der mit $289-293^{\circ}\text{C}$ keine bemerkenswerte Depression zeigte. In gleicher Weise stellten wir das Azetylprodukt von 5 mg Genistein her. Im Mischschmelzpunkt mit dem azetylierten Lupinus-Aglykon A_1 beobachteten wir keine Schmelzpunktsdepression. Damit stimmte Aglykon A_1 in den R_F -Werten, in den Farbreaktionen gegenüber verschiedenen Sprühreagenzien, im Schmelzpunkt, im UV-Spektrum und im Schmelzpunkt des Azetylprodukts sowie in den entsprechenden Mischschmelzpunkten mit Genistein überein. Den definitiven Identitätsbeweis der beiden Verbindungen lieferte die

Infrarotspektroskopie. Die Aufnahme des Aglykonspektrums mit darauffolgender Überlagerungsaufnahme (s. Abb. 11) authentischen Genisteins ergab eine Übereinstimmung der beiden Spektren, die jeden Zweifel an der Identität beider Verbindungen ausschloß.

Abbildung 11



Zuckeranteil der Substanz A₁

a) Zuckerart

Vom Hydrolysat des Glykosids trennten wir das Aglykon durch Ausschütteln mit Äther ab. Die wässrige Phase neutralisierten wir über eine mit einem Anionenaustauscher^{*)} präparierte Säule. Die papierchromatographische Untersuchung der so erhaltenen Zuckerlösung ergab die Anwesenheit von Glukose.

Der Schmelzpunkt des Osazons lag bei 199° C und bestätigte damit das Vorliegen von Glukose als Zuckerkomponente von Lupinus-Glykosid A₁.

b) Nachweis der mono-Glykosidstruktur

Die Bestimmung des CH-Wertes von Glykosid A₁ ergibt einen Gehalt von C = 59,56% und H = 5,20%. Eine Entscheidung über die Zahl der am Glykosid beteiligten Zuckermoleküle brachte der Vergleich mit den für ein Mono- bzw. Diglucosid errechneten CH-Werten.

	% C	% H
Lupinus A ₁ (432)	gef.: 59,56	5,20
Genistein-mono-glucosid (432)	ber.: 58,35	4,63
Genistein-di-glucosid (594)	ber.: 42,00	3,30

Daraus folgt, daß es sich bei Lupinus-Substanz A₁ um ein Genistein-mono-glucosid handelt.

c) Zuckerstellung

Die Bandenverschiebung im Natriumazetat-Milieu erlaubt nach Arbeiten von T. A. GEISSMAN und U. KRANEN-FIEDLER⁴⁷⁾ Aussagen über den Ort der Verglykosidierung.

Wir verglichen die UV-Spektren von Apigenin-7-glucosid, Apigenin-4'-glucosid, Genistein und Lupinus-Glykosid A₁ vor und nach Zusatz von frisch geschmolzenem und fein gepulvertem Natriumazetat (s. Tab. 8, S. 34).

47) T.A.GEISSMAN u. U.KRANEN-FIEDLER, Naturwissenschaften 43, 226 (1956)

*) Dowex 2 der Firma Dow Chemical International ltd., Midland/Michigan, USA

T a b e l l e 8

	Methanol p.a. Max.	+Na.-azetat Max.	Verschie- bung
Apigenin-7-glykosid	270 mμ	270 mμ	0 mμ
Apigenin-4'-glykosid	270 mμ	280 mμ	+10 mμ
Genistein	262 mμ	272 mμ	+10 mμ
Lupinus-Glykosid A ₁	262 mμ	262 mμ	0 mμ

Wie die Meßergebnisse an authentischem 5,7,4'-Trihydroxyisoflavin und dem einzigen zur Verfügung stehenden Isoflavonglykosid zeigen, unterscheiden sich die Isoflavone in dieser Beziehung nicht grundsätzlich von den Flavonen, an denen diese Gesetzmäßigkeit aufgefunden wurde.

Da das Spektrum der Substanz A₁ in alkalischem Milieu keine bathochrome Verschiebung erleidet, muß auf eine Verglykosidierung am C₇ geschlossen werden.

Zusammenfassung: Demnach ist die aus *Lupinus polyphyllus* Lindl. isolierte Substanz A₁ ein Genistein-7-mono-glucosid und damit identisch mit Genistin, einem Isoflavonglykosid, das bereits einmal von E. WALZ⁴⁸⁾ aus *Soja hispida* Moench isoliert worden war. Zwei weitere Genisteinglykoside, Sophoricosid und Sophoricobiosid, beides 4'-Glykoside, sind aus *Sophora japonica* L. isoliert worden⁴⁹⁾⁵⁰⁾.

3. Nebeninhaltsstoffe

Lupinus-Substanz A₂

Die zur Abtrennung von Lupinus-Substanz A₁ angewendete Isolierungsmethode der Chromatographie an Polyamidsäulen lieferte außerdem in den weiteren Fraktionen ein Kristallisat, das sich

48) W. WALZ, Liebigs Ann.Chem. 489, 118 (1931)

49) C. CHARAUX u. J. RABATE, J. Pharmac. Chim. 21, 546 (1935)

50) G. ZEMPLÉN u. R. BOGNÁR, Ber.dtsch.chem.Ges. 75, 482 (1942)

in papierchromatographischen Untersuchungen als einheitlicher Stoff erwies.

Die Substanz kristallisiert aus Methanol in feinen, farblosen bis schwach gelblichen Nadeln vom Schmelzpunkt 242-244° C.

Der Reduktionstest⁵¹⁾ mit Magnesium und Salzsäure verlief negativ. Mit Eisen-III-chlorid gab Substanz A₂ keine Färbung. Mit Aluminiumsulfat und Bleiazetat erhielten wir gelbe bzw. ockerfarbene Flavonkomplexe.

Die Refraktivitätswerte der Substanz stellten wir mit 0,66*¹⁾ und 0,71**¹⁾ fest.

Das UV-Spektrum zeigt zwei Absorptionsmaxima bei den Wellenlängen 267 mμ und 325 mμ.

Die Hydrolyse lieferte Apigenin und einen Zucker, der auf dem Wege der Dünnschichtchromatographie nach E. STAHL⁵²⁾ als Glukose identifiziert werden konnte.

Das IR-Spektrum deutet auf ein Flavon hin, dessen Seitenphenyl monosubstituiert ist. Im Bereich 1000 cm⁻¹ bis 1150 cm⁻¹ treten starke Banden auf, die den C-O-Valenzschwingungen der Zucker zuzuordnen sind.

Nach den im Teil II (S. 13 ff) erörterten Beobachtungen handelt es sich bei dieser Substanz um eine 5-Hydroxyverbindung. Zu dieser Annahme berechtigt neben der Lage der O-H Valenzschwingungsbande bei 3400 cm⁻¹ vor allem die Lage der Carbonylbande bei 1665 cm⁻¹.

Der Spektrenbereich, der Aufschluß über die Substitutionsverhältnisse am Seitenphenyl bei Flavonen gibt⁵³⁾, zeigt eine auffallende Ähnlichkeit mit dem einiger C₄-substituierter Verbindungen wie zum Beispiel den Flavonen Apigenin und Scutellarein. Eine Überlagerungsaufnahme dieser Substanzen in diesem Spektrenbereich ist in Abb. 16 auf Seite 41 wiedergegeben.

51) R. WILLSTÄTTER u. H. MALLISON, S.B. preuß. Akad. Wiss., physik.-math. Kl. (1914) 769

52) E. STAHL, Chem. Z. 82, 323 (1958)

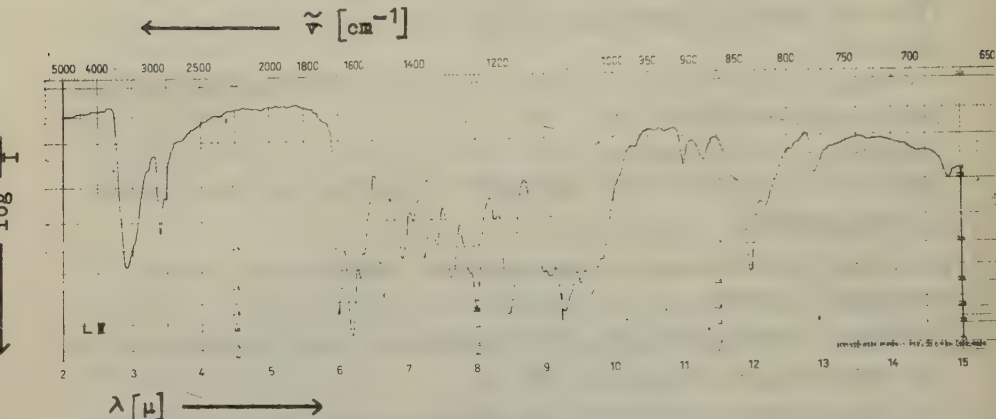
53) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. F. GLOGGENGIESSER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 291/63, 126 (1958)

*) System: Isopropanol-Ameisensäure-Wasser

**) System: Butanol-Eisessig-Wasser

Abbildung 12

Infrarotspektrum von Lupinus-Substanz A₂



Ähnliche Absorptionsverhältnisse konnten an den neun untersuchten Isoflavonen, von denen sechs eine C₄-Monosubstitution am Seitenphenyl aufweisen, nicht beobachtet werden.

Der Vergleich des IR-Spektrums von Lupinus-Substanz A₂ mit dem von Apigenin-7-monoglucosid ergab die Identität der beiden Verbindungen, die außerdem durch die Übereinstimmung in den papierchromatographischen Daten, Farbreaktionen, im UV-Spektrum, im Schmelzpunkt sowie im Mischschmelzpunkt mit aus *Matricaria Chamomilla* L. isoliertem Apigenin-7-monoglucosid⁵⁴⁾ gesichert werden konnte.

Lupinus-Substanzen B und C

Die Begleitflavone B und C in *Lupinus polyphyllus* Lindl. zeigten beim Besprühen mit Aluminiumsulfat und Bleiazetat typische gelbe bzw. ockerfarbene Flavonkomplexfarben und lieferten bei der Hydrolyse nur ein Aglykon, das auf papierchromatographischem Wege durch Vergleich der Laufhöhen in drei verschiedenen Systemen^{*)} sowie im Verhalten gegenüber verschiedenen Sprühreagenzien als Luteolin identifiziert werden konnte.

54) W. LANG u. K. SCHWANDT, Dtsch. Apotheker-Ztg. 8, 149 (1957)

*) Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2 + 5 + 5)
Essigester-Ameisensäure-Wasser (10 + 2 + 3)
Butanol-Eisessig-Wasser (4 + 1 + 5)

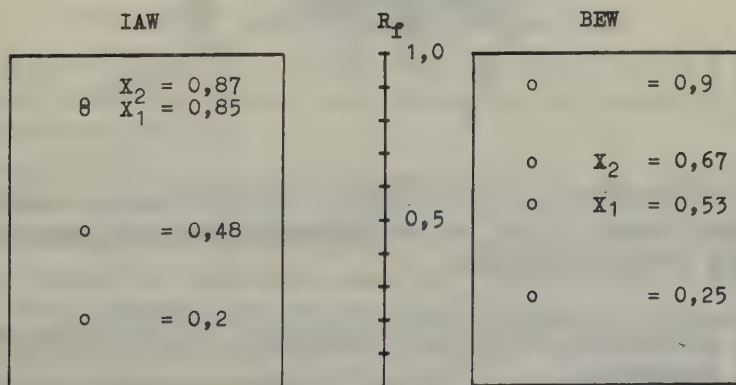
V. UNTERSUCHUNGEN AN TRIFOLIUM CAMPESTRE SCHREBER

1. Isolierung von Trifolium-campestre-Substanz X₂

D. H. CURNOW und R. C. ROSSITER⁵⁵⁾ hatten im Rahmen eines papierchromatographischen Überblicks über einige Kleearten das Auftreten einer "genisteinartigen" Verbindung in *Trifolium campestre* Schreb. beobachtet. Wir fanden bei der Untersuchung des methanolischen Frischpflanzenextrakts ebenfalls einen Substanzfleck mit den R_F -Werten 0,62^{*}) und 0,87^{**)}, der einen ähnlichen Eisenkomplex ausbildete, wie der bei den 5-Hydroxy-isoflavonen beobachtete.

Nachdem der Frischpflanzenextrakt nach den üblichen Verfahren von Ballaststoffen befreit und die Flavoninhaltsstoffe in der Essigester-Phase angereichert waren, resultierten vier Inhaltsstoffe, deren Laufhöhen in den Systemen Isopropanol-Ameisensäure-Wasser und Butanol-Eisessig-Wasser in Abb. 13 festgehalten sind.

Abbildung 13



Als "genisteinartige" Verbindungen kamen nur die Substanzen mit den R_F -Werten 0,67 und 0,53 in BEW - im weiteren mit Substanz

55) D.H.CURNOW u. R.C.ROSSITER, Austral.J.exp.Biol.med.Sci. 33, 243 (1955)

^{*}) System: Butanol-Eisessig-Wasser $\begin{pmatrix} 4 & + & 1 & + & 5 \end{pmatrix}$
^{**)} System: Isopropanol-Ameisensäure-Wasser $\begin{pmatrix} 2 & + & 5 & + & 5 \end{pmatrix}$

X_2 und Substanz X_1 bezeichnet - in Betracht. Die Abtrennung dieser Substanzen von den Begleitstoffen der Essigesterphase gelang durch Auskristallisation aus Methanol. Das dabei erhaltene Glykosidgemisch bestand in der Hauptsache aus Glykosid X_2 und geringen Mengen von Glykosid X_1 .

Die Auftrennung des Mischkristallisats erreichten wir über eine Magnesolsäule mit wassergesättigtem Essigester als mobiler Phase. Aus den Fraktionen 1 bis 4 dieser Säule erhielten wir das Glykosid X_2 in papierchromatographisch reiner Form als weiße nadelförmige Kristalle vom Schmelzpunkt $236-237^{\circ}$ C.

Abbildung 14

Trifolium-campestre-Glykosid X_2



Da Substanz X_1 im Verhältnis zu Glykosid X_2 nur in sehr geringen Mengen vorlag, war die Gewinnung über eine Magnesolsäule wenig erfolgversprechend.

2. Versuche zur Konstitutionsaufklärung von Trifolium-campestre-Substanz X_2

Arbeiten an Glykosid X_2

Die in den R_F -Werten 0,62 im System Butanol-Eisessig-Wasser und 0,87 im System Isopropanol-Ameisensäure-Wasser liegenden

Substanzflecke des Glykosids zeigten im UV-Licht sowie gegen verschiedene Reagenzien folgende Farbreaktionen:

Tageslicht	: nicht sichtbar	Al ⁺⁺⁺	: dunkel
UV-Licht	: dunkel	Pb ⁺⁺	: gelbgrün
NH ₃ -Dampf	: dunkel	Mg ⁺⁺	: grün
Fe ⁺⁺⁺	: grau	Ba ⁺⁺	: dunkel

Die quantitative Hydrolyse von 35,2 mg Glykosid X₂ lieferte 18,5 mg Aglykon, was einem Zuckeranteil von 47,4% des Glykosids X₂ entspricht.

Das UV-Spektrum weist zwei Absorptionsmaxima bei den Wellenlängen 277 mμ und 330 mμ auf.

Wir führten eine Acetylgruppenbestimmung des Glykosids durch und fanden dabei einen Anteil von 7,27% flüchtiger Säure, was bei einem Molekulargewicht von 648 1 CH₃CO-Gruppe entspricht.

Eine CH-Bestimmung des Glykosids ergab folgende Werte:

% C (648)	ber.:	55,55	gef.:	55,61
% H (648)	ber.:	5,26	gef.:	5,47

Eine Molekulargewichtsbestimmung nach K. RAST⁵⁶⁾ war nicht durchführbar, da die Substanz X₂ in Kampfer unlöslich war.

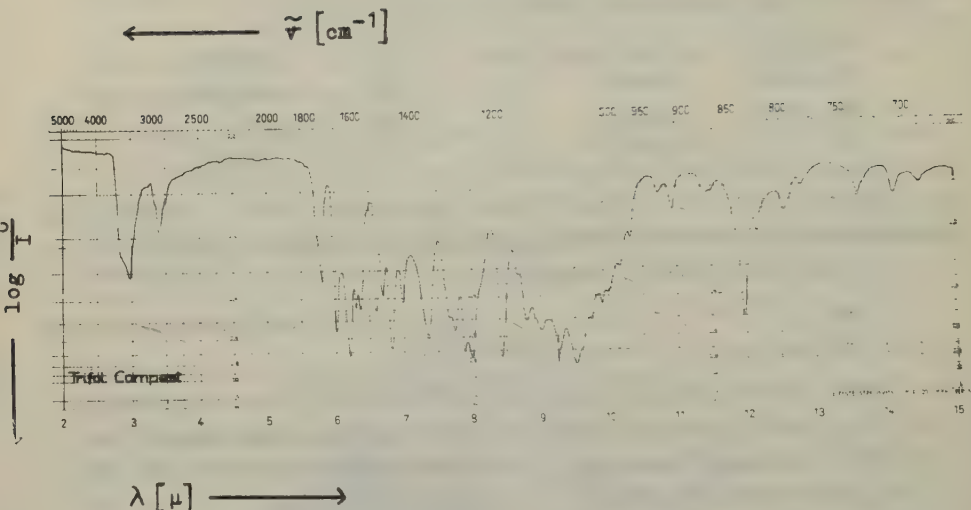
Das IR-Spektrum von Glykosid X₂ aus *Trifolium campestre* Schreb. (s. Abb. 15, S. 40) unterscheidet sich in auffallender Weise von den bisher betrachteten Spektren durch eine zusätzliche Absorptionsbande bei 1724 cm⁻¹. In der Reihe der von L. HÖRHAMMER und Mitarbeitern⁵⁷⁾ studierten Flavonspektren weist nur ein Vertreter diese Bande auf, nämlich Scutellarin (= Scutellareinglukuronsäure^{*}). Die Lage dieser Bande, die der C=O Valenzschwingung der Karboxylgruppe im Scutellarin

56) K. RAST, Ber.dtsch.chem.Ges. 55, 1051 u. 3727 (1922)

57) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. F. GLÖGGENGIESSER, Arch. Pharmaz. Ber.dtsch.pharmaz.Ges. 291/63, 126 (1958)

*) Scutellarein = 5,6,7,4'-Tetra-hydroxy-flavon

Abbildung 15



zuzuordnen ist, läßt daher auch im Glykosid X_2 das Vorliegen einer Estergruppierung erwarten.

Im Bereich 1000 bis 1100 cm^{-1} liegen die für Glykoside charakteristischen C-O-Valenzschwingungsbanden, die die glykosidische Struktur von Substanz X_2 bestätigen.

Die Substitutionsverhältnisse des Seitenphenyls scheinen ähnlich zu liegen wie bei C_4 -Flavonen. Die Spektren von Apigenin, Scutellarin, Lupinus A_2 und Trifolium-campestre-Glykosid X_2 im Absorptionsbereich zwischen 750 cm^{-1} und 950 cm^{-1} zeigt Abbildung 16 auf Seite 41.

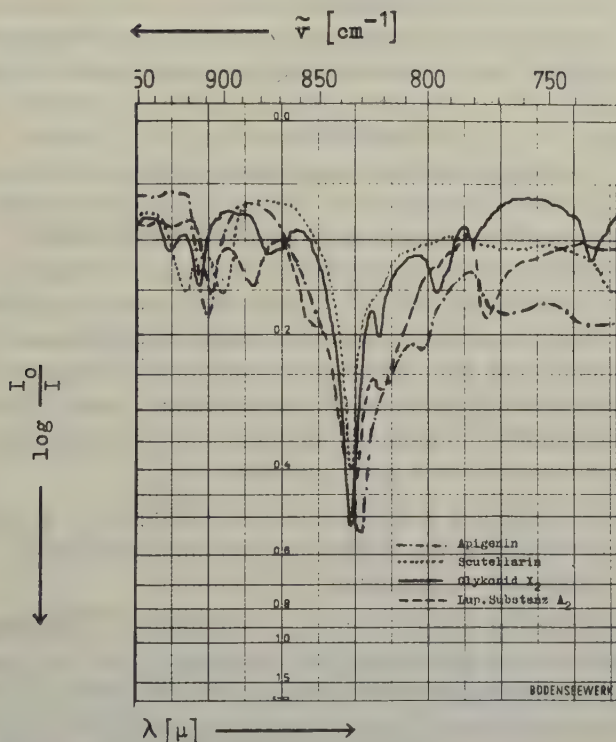
In diesem Bereich läßt sich eine weitgehende Übereinstimmung der Bande 835 cm^{-1} der Spektren der beiden isolierten Substanzen Lupinus A_2 und Trifolium campestre X_2 feststellen. Nach L. HÖRHAMMER und Mitarbeitern⁵⁷⁾ ist diese Bande in Übereinstimmung mit der von H. DANNENBERG und Mitarbeitern⁵⁸⁾ vorgeschlagenen

57) L. HÖRHAMMER, H. WAGNER u. F. GLOGGENGIESSER, Arch. Pharmaz. Ber. dtsh. pharmaz. Ges. 291/63, 126 (1958)

58) H. DANNENBERG, U. SCHIEDT u. W. STEIDLE, Z. Naturforsch. 8b, 269 (1953)

Zuordnungstafel für substituierte Benzolringe einwandfrei der γ -Schwingung des para-substituierten Seitenphenyls zuzuordnen.

Abbildung 16



Für Substanz X_2 konnte im Rahmen der Arbeiten zur Strukturaufklärung dieser Substanz eine para-substituierte aromatische Säure nachgewiesen werden, womit die C_4 -Substitution des ursprünglich vorliegenden Flavons bewiesen ist. Die Spektren der untersuchten C_4 -substituierten Isoflavone zeigen in diesem Absorptionsbereich ein völlig abweichendes Bild.

Nähere Charakterisierung des Aglykons

Wir stellten den S c h m e l z p u n k t des Aglykons X_2 auf dem Kofler Heizblock mit $216-217^{\circ}$ C fest.

Da eine in üblicher Weise durchgeführte A z e t y l i e - r u n g mit Natriumazetat und Pyridin bei einer Azetylierungsdauer von drei Stunden keinen Erfolg brachte, variierten wir die Reaktionsbedingungen. Eine Erklärung dafür, warum es auch hierdurch nicht gelang, ein gut kristallisierendes Azetylprodukt zu erhalten, bietet das mögliche Vorliegen eines Substituenten am C_6 , der auf Grund einer sterischen Hinderung die Bildung eines kristallinen Azetylprodukts verhindern kann⁵⁹⁾. Die Annahme einer Hydroxylsubstitution am C_6 steht im Einklang mit der Beobachtung, daß die Ausbildung der für C_5 -Hydroxyflavone typischen Farbkomplexe mit Aluminiumsulfat und Bleiazetat bei Substanz X_2 nicht erfolgt, obwohl die Lage der Carbonylbande im IR-Spektrum von X_2 eine freie Hydroxylgruppe am C_5 voraussetzt. Nach Untersuchungen von W.KIRMAYER⁶⁰⁾ wird die Bildung von 5-Hydroxy-flavonkomplexen durch Substitution am C_6 gestört.

Die M e t h o x y l g r u p p e n b e s t i m m u n g von Aglykon X_2 ergab einen Wert von 6,58%. Es ist also mit einer Methoxylgruppe im Molekül zu rechnen.

Aglykon X_2 gibt im R e d u k t i o n s t e s t ⁶¹⁾ mit Magnesium und Salzsäure eine deutliche Orangefärbung, die auf eine Flavonstruktur schließen läßt.

Die R_f - W e r t e des Aglykons liegen bei 0,88^{*)} und 0,61^{**)}.

Die U V - S p e k t r e n von Glykosid und Aglykon stimmen in der Lage der Absorptionsmaxima im wesentlichen überein. Im Spektrum des Glykosids ist eine deutliche Überhöhung des Maximums bei 330 m μ gegenüber dem Aglykonspektrum festzustellen.

59) R.SEMRAU, Dissertation, München 1958

60) W.KIRMAYER, Dissertation, München 1959

61) R.WILLSTÄTTER u. H.MALLISON, S.B.preuß.Akad.Wiss., phys. math.Kl. 769 (1914)

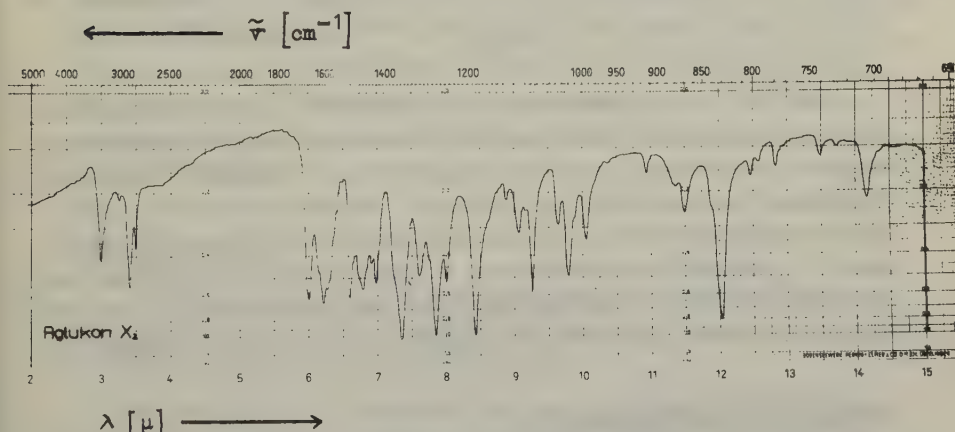
*) System: Butanol-Eisessig-Wasser

**) System: Isopropanol-Ameisensäure-Wasser

Im I R - S p e k t r u m von Glykosid X_2 ist die C=O Valenzschwingungsbande bei 1724 cm^{-1} nach der Hydrolyse vollständig verschwunden, ohne daß eine entsprechende Karboxylbande neu aufgetreten ist, wie dem Spektrum des Aglykons (s. Abb. 17) zu entnehmen ist. Die Intensität einer weiteren Bande bei 1250 cm^{-1} , die in Verbindung damit ebenfalls ein Charakteristikum für die Esterbindung darstellt, ist wesentlich zurückgegangen.

Abbildung 17

Trifolium campestre Schreb. Aglykon X_2



Da die Lage der C=O Valenzschwingungsbande bei 1724 cm^{-1} eine Phenolacylgruppe ausschließt, ist anzunehmen, daß die Estergruppe im Zuckerrest eingebaut war.

Wir führten eine Prüfung der Substanz auf Flavanonstruktur nach dem von C. D. DOUGLAS, Q. L. MORRIS und S. H. WENDER⁶²⁾ angegebenen Verfahren durch. Aglykon X_2 ließ keine Hydrazonebildung erkennen. Es lag somit keine Flavanonstruktur vor.

In Anlehnung an eine von F. E. KING, T. J. KING und A. J. WARWICK⁶³⁾ beschriebene Methode führten wir eine A l k a l i - s p a l t u n g durch. Dabei konnte keine Ameisensäure nachge-

62) C.D.DOUGLAS, Q.L.MORRIS u. S.H.WENDER, J.Amer.chem.Soc. 73, 4023 (1951)

63) F.E.KING, T.J.KING u. A.J.WARWICK, J.chem.Soc.(London) 96 (1952)

wiesen werden, wodurch das Vorliegen einer Isoflavonstruktur ausscheidet.

In Kontrollversuchen mit Muningin, Rutin, Quercitrin und Orobol erfolgte der Nachweis der Ameisensäure in einer von N. D. CHERONIS⁶⁴⁾ beschriebenen Apparatur nach dem bei J. HOUBEN und Th. WEYL⁶⁵⁾ angegebenen Verfahren der Reduktion von Quecksilber-II-chlorid. Da das Auftreten von Ameisensäure als Alkaliabbau-produkt für Isoflavone charakteristisch ist und die angewendeten Nachweismethoden zur Erfassung der dabei entstehenden geringen Mengen geeignet waren, wie die Ergebnisse der systematischen Ab-bauversuche zeigen, handelt es sich bei Trifolium-campestre-Schreber-Substanz X₂ nicht um ein Isoflavon.

Das von D. H. CURNOW und R. C. ROSSITER⁶⁶⁾ in Trifolium campestre beobachtete Auftreten von "Genistein bzw. einer nah verwandten Verbindung" sowie die Angaben von W. KARRER⁶⁷⁾ über das Vorkommen von Genistein in Trifolium campestre konnten somit nicht bestätigt werden. Die hier untersuchte Substanz X₂ zeigt zwar - ähnlich wie Genistein - eine rötliche Verfärbung auf dem unbesprühten Chromatogramm. Eine Isoflavonstruktur und darüberhinaus eine Identität mit Genistein liegt jedoch nicht vor.

Zuckeranteil von Substanz X₂

Glykosid X₂ lieferte bei der Hydrolyse neben Aglykon X₂ zwei Zucker, die papierchromatographisch, sowie nach dem Verfahren der Dünnschichtchromatographie als Glukose und Rhamnose identifiziert werden konnten.

Zur Klärung der Z u c k e r s t e l l u n g am Molekül diente das von T. A. GEISSMAN und U. KRANEN-FIEDLER⁶⁸⁾ angegebene

64) N.D.CHERONIS, "Micro- and Semimicro Methods", New York 1954

65) J.HOUBEN u. Th.WEYL, "Methoden der organischen Chemie", Stuttgart 1953, Bd. II, S. 944

66) D.H.CURNOW u. R.C.ROSSITER, Austral.J.exp.Biol.med.Sci. 33, 243 (1955)

67) W.KARRER, "Konstitution und Vorkommen der organischen Pflanzenstoffe", Basel 1958, S. 654

68) T.A.GEISSMAN u. U.KRANEN-FIEDLER, Naturwissenschaften 43, 226 (1956)

Verfahren der Untersuchung der UV-Spektren im neutralen und alkalischen Milieu, wobei wir folgende Werte erhielten:

	Methanol p.a. Max. I	+ Natriumazetat Max. I	Ver- schiebung
Glykosid X ₂	330 mμ	330 mμ	0
Aglykon X ₂	330 mμ	360 mμ	+30

Das Glykosid erfährt in alkalischem Milieu keine bathochrome Verschiebung. In Analogie zu den Ergebnissen von T. A. GEISSMAN und U. KRANEN-FIEDLER⁶⁹⁾ an Apigenin-7-glykosid und Apigenin-4'-glykosid sowie zu eigenen Meßergebnissen an Lupinusglykosid A₁ und Genistein, die in Tabelle 8 dieser Arbeit (S. 34) aufgezzeichnet sind, kann daraus auf eine Verglykosidierung am C₇ geschlossen werden.

Zusammenfassung:

In Substanz X₂ aus *Trifolium campestre* Schreber liegt ein Flavonglykosid vor, das bei der Hydrolyse Glukose, Rhamnose und ein Trihydroxy-methoxy-flavon liefert.

Das Aglykon ist identisch mit einem von W. KIRMAYER⁷⁰⁾ aus *Cirsium oleraceum* (L.) Scop. isolierten Flavon. Arbeiten zur Klärung der Stellung der Substituenten sind zur Zeit im Gang⁷¹⁾. Eine Besonderheit des Glykosids stellt die Estergruppierung im Zuckeranteil dar.

69) T.A.GEISSMAN u. U.KRANEN-FIEDLER, Naturwissenschaften 43, 226 (1956)

70) W.KIRMAYER, Dissertation, München 1959

71) W.KIRCHNER, Dissertation, München (in Vorbereitung)

C. Experimenteller Teil

I. SYSTEMATISCHE UNTERSUCHUNGEN AN ISOFLAVONEN

1. Herkunft der Substanzen

Unsere vergleichenden Untersuchungen umfaßten neun von den elf Isoflavonen mit gesicherter Struktur, die W. K. WARBURTON⁷²⁾ bis zum Jahre 1954 registriert hat. Genistein isolierten wir aus *Genista tinctoria* L., die restlichen Isoflavone verdanken wir der Freundlichkeit der Professoren, E. Cheng, Iowa, USA; T. R. Seshadri, University of Delhi, Indien; G. S. Pope, University of Reading, England; R. Paris, Laboratoire de Matière Médicale, Faculté de Pharmacie, Paris; T. Swain, University of Cambridge, England; W. D. Ollis, University of Bristol, England; F. E. King, University of Nottingham, England.

2. Isolierung von Genistein aus *Genista tinctoria* L.

Das Ausgangsmaterial bildeten 2 Liter Methanolextrakt aus *Genista tinctoria*, der aus früheren Isolierungsversuchen des Instituts stammte. Die Identität dieses Extrakts mit einem Methanolextrakt aus selbstgesammeltem Pflanzenmaterial aus dem Botanischen Garten, München, ergab der papierchromatographische Vergleich.

Wir dampften den Methanolextrakt bis zur Sirupdicke ein, digerierten mehrmals mit insgesamt 1000 ml heißem Wasser und filtrierten durch Watte vom Chlorophyll ab. Die wässrige Lösung ließen wir über Nacht im Kühlschrank stehen, wobei weitere Ballaststoffe ausfielen, die durch Filtration abgetrennt wurden. Die so gereinigte Flavonlösung schüttelten wir nacheinander mit 200 ml Benzin, 500 ml Äther und 500 ml Essigester aus. Beide Aglykone waren in der Ätherphase angereichert. Diese Phase nahmen wir nach dem Abdampfen des Äthers mit 200 ml Methanol

72) W.K.WARBURTON, Quart.Rev. 8, 67 (1954)

auf und versetzten sie mit 50 ml einer 10%igen wässrigen Lösung von neutralem Bleiazetat. Im Gegensatz zu basischem Bleiazetat, das mit dem größten Teil aller Flavonkörper unlösliche Komplexe bildet, gelingt es mit neutralem Bleiazetat nur solche Flavone auszufällen, die eine ortho-Dihydroxygruppierung aufweisen. Wir filtrierten vom ausgefallenen Luteolin-Bleikomplex ab und reinigten die Lösung, indem wir sie auf eine Polyamidsäule von 40 cm Höhe und 3 cm Durchmesser gaben und mit reinem Methanol entwickelten. Aus Fraktion 4 erhielten wir ca. 4 mg reines Genistein in Form von farblosen nadelförmigen Kristallen.

3. Papierchromatographie

Zur Verwendung gelangte ausschließlich Papier der Firma C. Schleicher & Schüll, in den meisten Fällen die Papiersorte Nr. 2043b Gl., für die Untersuchungen der Genistein-Eisenkomplexe auch die Sorte Nr. 2043b Gl. "ausgewaschen". Für die Chromatographie von Säuren aus dem Alkaliabbau verwendeten wir Kationen-austauschpapier der Firma C. Schleicher & Schüll.

Wir arbeiteten nach der absteigenden Methode und bedienten uns folgender Lösungsmittelsysteme:

Isopropanol - Ameisensäure - Wasser (2 + 5 + 5)

Äthylazetat - Ameisensäure - Wasser (10 + 2 + 3)

Butanol - Eisessig - Wasser (4 + 1 + 5).

Von den beiden letzten Laufmitteln kam jeweils die Oberphase zur Verwendung.

Zum Besprühen der Chromatogramme benützten wir folgende Reagenzien:

Eisenchlorid:	0,05%ige wässrige Lösung
Magnesiumazetat :	gesättigte äthanolische Lösung
Aluminiumsulfat :	5%ige wässrige Lösung
Bleiazetat :	Bleiessig nach DAB 6
Zirkonoxychlorid :	2%ige methanolische Lösung
Bariumhydroxyd :	Barytwasser nach DAB 6.

Die mit Eisenchlorid behandelten Chromatogramme wurden im Tageslicht, alle übrigen unter der Analysenquarzlampe betrachtet.

II. Spektrophotometrische Untersuchungen

1. UV-Spektren

a) Quantitative Spektren

Wir lösten 7,6 mg Orobol in 1000 ml Methanol p.a. und maßen die Lösung in Quarzküvetten von 1 cm Schichtdicke mit dem Zeiss-Opton-Spektrophotometer M 4 Qu.

Den spezifischen Extinktionskoeffizienten errechneten wir nach der Formel

$$E_{\text{spez.}} = \frac{E_{\text{gemessen}}}{c \cdot d}$$

c = Konzentration in g/l

d = Schichtdicke in cm.

b) UV-Spektren im Natriumazetat-Milieu

Wir versetzten die ca. 0,05%igen Lösungen der Isoflavone in absolutem Alkohol mit einem Überschuß an frisch getrocknetem Natriumazetat, schüttelten 5 Minuten, dekantierten vom ungelösten Natriumazetat ab und nahmen die UV-Spektren auf.

UV-Spektren in Aluminiumchloridlösung:

Ca. 3 ml der unter b) angefertigten 0,05%igen Isoflavonlösung mischten wir mit 1 ml einer 0,01 mol. Aluminiumchloridlösung (in absolutem Alkohol) gut durch und maßen die Absorption im ultravioletten Bereich.

2. Infrarotspektroskopische Untersuchungen

Die Aufnahme der Infrarotspektren der genau gewogenen und mit Kaliumbromid zu Preßlingen verarbeiteten Isoflavone bzw. der isolierten Substanzen unbekannter Struktur erfolgte im Perkin-Elmer-Infrarotspektrophotometer Nr. 21. Einige Substanzen, die nur in geringer Menge zur Verfügung standen, mußten in Mikroscheiben gemessen werden.

Die Konzentrationen, in denen die Absorption im infraroten Bereich gemessen wurde, sind in nachfolgender Tabelle festgehalten:

T a b e l l e 9

Seite	Abb.	Substanz	Konz. in γ	mg·KBr
32	11	Genistein-Lup.A ₁	870/190	300/100
36	12	Lupinus A ₂	2100	300
40	15	Glykosid X ₂	200	100
43	17	Aglykon X ₂	790	300
60	18	Daidzein	150/70	100/100
60	19	Pseudo-Baptigenin	ca. 100	100
60	20	Muningin	790	300
61	21	Prunetin	ca. 100	100
61	22	Biochanin A	800	300
62	23	Irigenin	3000	300
62	24	Formononetin	902	300
62	25	Genistein	1135	300
63	26	Orobol		

III. ISOLIERUNGEN AUS LUPINUS POLYPHYLLUS LINDL.

1. Isolierung von Substanz A₁

a) Herkunft des Pflanzenmaterials

Das frische Pflanzenmaterial stammte aus Waldlichtungen in der Nähe von Fürstenfeldbruck. Bei den im Juni geernteten Pflanzen war der Genisteingehalt wesentlich höher als bei den im Spätherbst - Ende Oktober - geernteten Lupinen. Ebenso ließ sich aus getrocknetem Material weniger extrahieren als aus den frischen Pflanzen.

Ähnliche Beobachtungen machte D. H. CURNOW⁷³⁾ in Australien bei der Isolierung von Genistein aus frischem Klee, *Trifolium subterraneum* L. Er erzielte eine Ausbeute von 12 mg pro 100 g, während R. B. BRADBURY und D. E. WHITE⁷⁴⁾ einige Jahre früher zur Isolierung von 17,8 g Genistein aus der Chloroplast-Fraktion desselben Klees 4000 kg Ausgangsmaterial benötigt hatten.

b) Reduktionstest⁷⁵⁾

2 ml des nach der Abtrennung des Chlorophylls erhaltenen wässerigen Extrakts versetzten wir im Reagenzglas mit etwa 20 mg Magnesiumpulver, kühlten das Glas in kaltem Wasser und setzten unter leichtem Schütteln tropfenweise 15%ige Salzsäure hinzu.

c) Isolierungsgang

Wir extrahierten jeweils 200 g Frischpflanzenmaterial erschöpfend mit 500 ml Methanol im Soxhlet. Zur Abtrennung des Chlorophylls dampften wir den Extrakt bis zur Sirupdicke ein und mazerierten mehrmals mit je 200 ml heißem Wasser. Aus dem wässerigen Extrakt fielen beim Stehen über Nacht im Kühlschrank weitere Ballaststoffe aus. Die so erhaltene wässerige Flüssigkeit schüttelten wir nacheinander mit 100 ml Benzin, 200 ml Äther und 1000 ml Essigester aus. Die Essigesterausschüttelung dampften wir zur Trockene ein und nahmen den gelb gefärbten Rückstand mit ca. 200 ml Methanol auf. Aus der auf 100 ml eingeeengten Lösung erhielten wir nach einmaligem Umkristallisieren 100 mg Mischkristallisat. Wir lösten je 20 mg dieses Mischkristallisats in möglichst wenig Methanol (ca. 5 ml), gaben die Lösung auf eine 60 cm hohe Polyamidsäule und entwickelten mit Methanol als mobiler Phase.

73) D. H. CURNOW, *Biochem.J.* 58, 283 (1954)

74) R. B. BRADBURY u. D. E. WHITE, *J.chem.Soc.(London)* 3447 (1951)

75) R. WILLSTÄTTER u. H. MALLISON, *S.B.preuß.Akad.Wiss., phys.math.Kl.* 769 (1914)

Aus 3 kg Frischpflanzenmaterial erhielten wir auf diese Weise insgesamt 140 mg Substanz A₁.

2. Identifizierung der Substanz A₁

a) Eisen-III-chloridreaktion

Am geeignetsten erwies sich folgende Methode:
Wir übersprühten ca. 0,5 ml der Flavonlösung auf einer weißen Porzellanplatte leicht mit 0,05%iger wässriger Eisen-III-chloridlösung. Die sofort auftretende rötliche Verfärbung schlug beim Übersprühen mit 0,1 n Salzsäure in einen olivgrünen Farbton um. Beim nochmaligen Übersprühen mit 0,1 n Natronlauge trat die rötliche Farbe wieder auf.

b) UV-Spektrum

Die Messung der Absorption im ultravioletten Bereich führten wir mit Isoflavonkonzentrationen um 0,05 mg pro 100 ml Methanol p.a. "E.MERCK" durch. Wir benützten dazu die Meßgeräte Unicam Quarz-Spektrophotometer S.P. 500 der Firma Unicam Instruments, Cambridge, England, sowie den Zeiss-Opton M 4 Qu.

c) Hydrolyse

Wir lösten 30 - 50 mg des Glykosids in einem Gemisch von 10 ml 10%iger Schwefelsäure bzw. 7,5%iger Salzsäure und 3 ml Methanol und erhitzten das Hydrolysengemisch 12 Stunden am Rückfluß zum Sieden. Nach dieser Reaktionszeit die gegebenenfalls auf 8 Stunden verlängert wurde, erhitzen wir ohne Kühlung bis der zugesetzte Alkohol verdampft war, ließen das Reaktionsprodukt abkühlen, schüttelten mit 100 ml Äther aus, trockneten die Ätherausschüttelung mit Natriumsulfat und dampften die so erhaltene reine ätherische Aglykonlösung zur Trockene ein. Ein kristallines

Aglykon erhielten wir durch Umkristallisation des Trockenrückstands aus ca. 25 ml Methanol.

d) Azetylierung

Wir erhitzen ca. 5 mg Genistein mit 1 ml Essigsäureanhydrid und 0,1 g frisch geschmolzenem, getrocknetem und fein gepulvertem Natriumazetat und einem Tropfen Pyridin in einem Mikroazetylierkölbchen von 5 ml Fassungsvermögen und hielten das Reaktionsgemisch 1 Stunde am Luftbad über dem Asbestnetz im Sieden. Nach dem Abkühlen versetzten wir mit ca. 4 ml Wasser und ließen zur Kristallisation stehen. Nach einer Viertelstunde hatte sich ein kristalliner weißer Niederschlag gebildet, den wir abfiltrierten, in heißem Methanol lösten und zur Umkristallisation in den Kühlschrank stellten.

In gleicher Weise azetylierten wir 3 mg Aglykon A₁.

e) Alkaliabbau

Alkalische Hydrolyse:

In Anlehnung an die von F. E. KING, T. J. KING und A. J. WARWICK⁷⁶⁾ angegebene Methode führten wir mit 12,9 mg Substanz A₁ eine alkalische Hydrolyse durch. Wir versetzten das Glykosid mit 10 ml 4%iger wässriger Kalilauge und erhitzen 30 Minuten am Rückfluß im siedenden Wasserbad. Nach dem Erkalten säuerten wir mit Phosphorsäure schwach an und unterwarfen das Hydrolysat in einer nach Angaben von N. D. CHERONIS⁷⁷⁾ angefertigten Mikroapparatur einer Wasserdampfdestillation. Wir destillierten 2 ml über, wobei das Destillat unmittelbar am Kühlfinger der Apparatur in einer Vorlage von 2 ml 5%iger wässriger Quecksilber-II-chloridlösung aufgefangen wurde. Nach beendeter Destillation erhitzen wir

76) F.E.KING, T.J.KING u. A.J.WARWICK, J.chem.Soc.(London) 96 (1952)

77) N.D.CHERONIS, "Micro- and Semimicro Methods", New York 1954

die Vorlage am Rückfluß 2 Stunden im siedenden Wasserbad. Der dabei auftretende weiße Niederschlag war nach J. HOUBEN und Th. WEYL⁷⁸⁾ beweisend für die Anwesenheit von Ameisensäure im Destillat.

Alkalischmelze:

In einen Schmelztiegel gaben wir 10 mg Substanz A₁ zu 5,0 g geschmolzenem Kaliumhydroxyd und hielten das Gemisch genau 2 Minuten im Sieden. Nach dem Erkalten lösten wir die nun gelb gefärbte Glasur in einigen Tropfen Wasser, säuerten mit verdünnter Schwefelsäure an und schüttelten mit 50 ml Äther aus. In dieser Ätherausschüttelung konnten wir papierchromatographisch p-Hydroxybenzoesäure durch Vergleich der R_F-Werte in verschiedenen Systemen^{*)} sowie durch Farbreaktionen mit Eisenchloridlösung bzw. mit einem Diazo-reagens nachweisen.

Mit Eisenchlorid gab p-Hydroxybenzoesäure eine ocker-gelbe Färbung. Zur Durchführung der Diazoreaktion nach R. NEU⁷⁹⁾ auf dem Chromatogramm besprühten wir zunächst mit einer frisch zubereiteten Mischung aus gleichen Teilen einer 0,5%igen methanolischen Lösung von Kaliumnitrit und einer Lösung von 0,5 g Sulfanilsäure in n-Salzsäure. Nach dem Trocknen der Chromatogramme besprühten wir mit 0,5 n Kalilauge. P-Hydroxybenzoesäure gab sich durch eine zitronengelbe Färbung zu erkennen.

f) Zuckernachweis

Wir neutralisierten das nach der Abtrennung des Aglykons durch Ätherausschüttelung verbliebene saure Hydrolysat über eine Dowexsäule^{**)} von 20 cm Höhe und 1 cm Durchmesser.

78) J. HOUBEN u. Th. WEYL, "Methoden der organischen Chemie", Stuttgart, 1953, Bd. II, S. 944

79) R. NEU, "Über die Verwendung stabiler Diazoniumsalze als Reagenzien in der Papierchromatographie", Berlin-Göttingen-Heidelberg 1956

*) Butanol-Eisessig-Wasser (4+1+5) und Essigsäure, 15%ig.

**) Dowex 2 der Firma Dow Chemical International ltd., Midland, Michigan, USA.

Die neutrale Zuckerlösung engten wir auf ca. 1 ml ein und chromatographierten sie im System Pyridin-Essigester-Wasser (1+2+2). Die getrockneten Chromatogramme besprühten wir mit einer 5%igen Lösung von Anilinphthalat in n-Butanol und erhitzen sie 10 Minuten auf 105° C.

Mit dem Hauptteil der neutralen Zuckerlösung stellten wir in üblicher Weise das Osazon dar.

Zur Untersuchung der Zuckerstellung waren Messungen der UV-Spektren im Natriumazetatmilieu durchzuführen. Wir stellten die Isoflavonlösungen nach der im Teil 2. b) auf Seite 51 beschriebenen Art her und versetzten sie in der Quarzküvette mit so viel frisch getrocknetem Natriumazetat, daß ein Teil ungelöst als Bodensatz blieb. Diese gesättigte Lösung schüttelten wir 5 Minuten, ließen absetzen und maßen die Absorption im ultravioletten Licht.

3. Lupinus-Substanz A₂

a) Hydrolyse

Ca. 20 mg Substanz A₂ versetzten wir mit 10 ml 8%iger Salzsäure. Zur besseren Löslichkeit von Substanz A₂ setzten wir 1 ml Methanol zu. Das Hydrolysengemisch hielten wir 7 Stunden auf dem Luftbad im Sieden und filtrierten nach dem Erkalten vom ausgefallenen Aglykon ab.

b) Zuckernachweis

Bereitung der Platten:

Wir verrührten in einer Reibschale 20,0 g Kieselgel G "Merck" mit 35 ml destilliertem Wasser zu einer homogenen Masse und verteilten diese Masse mittels eines Metallschiebers in einer gleichmäßigen Schicht von 1 bis 2 mm Dicke

auf 5 Glasplatten von je 20 cm Länge und 15 cm Breite. Die fertig gestrichenen Platten brachten wir sofort in den Trockenschrank und trockneten sie bei 110° C 20 Minuten lang.

Zuckerchromatographie:

Die auf wenige Tropfen eingeengte salzsaure Hydrolysenflüssigkeit, von der das ausgefallenen Aglykon abfiltriert worden war, trugen wir mit Hilfe von Glaskapillarröhrchen auf der Startlinie der Platten auf. Wir chromatographierten aufsteigend im System Butanol-Eisessig-Wasser (70+30+5), dessen Zusammensetzung eine Chromatographie von sauren Lösungen ermöglicht, wobei R_f -Depressionen auf Grund des p_H -Wertes vermieden werden⁸⁰⁾.

Die fertigen Dünnschichtchromatogramme besprühten wir mit einer 5%igen Anilinphthalatlösung in n-Butanol und erhitzen sie 10 Minuten auf 105° C .

80) H. RÖSLER, Dissertation, München (in Vorbereitung)

IV. TRIFOLIUM-CAMPESTRE-SUBSTANZ X₂

1. Isolierung

Auf Grund der Erfahrungen bei der Isolierung von Lupinus-Substanz A₁ gingen wir ebenfalls von der zerkleinerten Frischpflanze aus, stellten aus je 200 g (insgesamt 2 kg) durch erschöpfende Soxhletextraktion einen Methanolauszug her und reinigten ihn in der im Teil C, I unter 2. (S. 46) beschriebenen Weise von Ballaststoffen.

Die hierbei erhaltene wässrige Lösung schüttelten wir mit Äther und anschließend mit Essigester aus. Die Essigesterausschüttelung dampften wir zur Trockene ein und lösten den Rückstand in 200 g heißem Methanol, engten die methanolische Lösung auf die Hälfte ihres Volumens ein und stellten sie über Nacht in den Kühlschrank.

Das ausgefallene Mischkristallisat lösten wir in möglichst wenig Azeton (ca. 5 ml) und gaben diese Lösung auf eine Magnesolsäule^{*)} von 5 cm Höhe, die mit wasserfreiem Azeton vorbereitet worden war. Als mobile Phase diente wassergesättigter Essigester. Glykosid X₂ wanderte als dunkle Zone im ultravioletten Licht und konnte in den ersten vier Fraktionen dieser Säule in papierchromatographisch reiner Form gewonnen werden. Durch Umkristallisation aus heißem Methanol erhielten wir das Glykosid in feinen nadelförmigen Kristallen.

Aus insgesamt 1,8 kg frischem Ausgangsmaterial isolierten wir auf diesem Weg 240 mg Glykosid X₂.

Da die Trennung des Glykosidgemisches anfänglich Schwierigkeiten machte, hydrolysierten wir das nach der Essigesterausschüttelung erhaltene Mischkristallisat von 200 g Ausgangsmaterial direkt mit 10 ml 10%iger Schwefel-

*) Magnesiumtrisilikat

säure 3 Stunden am Rückfluß und trennten das Aglykongemisch über eine Polyamidsäule von 40 cm Höhe mit reinem Methanol als Laufmittel. Aus Fraktion 1 und 2 dieser Säule erhielten wir 3 mg kristallines Aglykon X_1 , die drei nächsten Fraktionen lieferten insgesamt 10 mg Aglykon X_2 in kristalliner Form.

2. Hydrolyse

Die Hydrolyse von 69,8 mg Glykosid X_2 mit einem Gemisch aus 5 ml Methanol und 5 ml 15%iger Salzsäure ging ohne Schwierigkeiten vonstatten. Nach einer Hydrolysedauer von 3 Stunden filtrierten wir vom ausgefallenen Aglykon ab, lösten es in Äther, trockneten den Äther und erhielten durch Abdunsten des Äthers 30,3 mg Aglykon X_2 .

3. Azetylierungsversuche

führten wir in folgender Weise durch:

- a) mit 30,3 mg Aglykon X_2 , 1 ml Essigsäureanhydrid, 0,5 g wasserfreiem Natriumazetat und 5 Tropfen Pyridin.
Azetylierungsdauer: 3 Stunden.
- b) mit 7 mg Aglykon X_2 nach dem bei der Azetylierung von Genistein auf Seite 52 beschriebenen Mikroverfahren.
Azetylierungsdauer: 1 Stunde.
- c) mit 15 mg Glykosid X_2 , 1 ml Essigsäureanhydrid, 0,1 g wasserfreiem Natriumazetat ohne Zusatz von Pyridin.
Azetylierungsdauer: 4 Stunden.

Ein einheitliches kristallines Azetylprodukt konnte dabei auch nach mehrtägigem Stehenlassen im Kühlschrank nicht erreicht werden. Wir schüttelten daher das wässrige Reaktionsprodukt mit Äther aus und chromatographierten in zwei verschiedenen Systemen^{*)}.

*) Butanol-Eisessig-Wasser (4 + 1 + 5)
Isopropanol-Ameisensäure-Wasser (2 + 5 + 5)

Während im ersten System ein unter der Analysenquarzlampe blau fluoreszierender Fleck vom R_F -Wert 0,9 die vollzogene Azetylierung zeigte, ließ das Chromatogrammbild im System Isopropanol-Ameisensäure-Wasser am Auftreten von zwei blau fluoreszierenden Flecken in den R_F -Werten 0,87 und 0,75 erkennen, daß dabei kein einheitliches Azetylprodukt entstanden war.

4. Prüfung auf Flavanonstruktur

Zur Darstellung des Hydrazons nach C. D. DOUGLAS, Q. L. MORRIS und S. H. WENDER⁸¹⁾ erhitzen wir 0,1 ml einer 1%igen methanolischen Lösung von Aglykon X_2 mit 1 ml einer 1%igen methanolischen Dinitro-phenylhydrazinlösung, die 2 ml Schwefelsäure/100 ml enthielt, im Wasserbad von 50° C 1 Stunde und versetzten nach dem Abkühlen mit 4 ml 10%iger Natronlauge. Wir beobachteten dabei keine wesentliche Farbveränderung. Das UV-Spektrum ließ keine Hydrazonbildung erkennen.

In Kontrollversuchen stellten wir unter gleichen Versuchsbedingungen die Hydrazone der Flavanonaglykone Hesperetin und Homoeriodictyol sowie des Flavanonglykosids Naringin her. Bei allen drei Vergleichsproben trat nach Zusatz von Natronlauge eine deutliche Rotverfärbung auf. Die UV-Spektren der drei Flavanone zeigten nach der Reaktion mit Dinitro-phenylhydrazin alle ein Maximum bei 400 m μ .

5. Prüfung auf Isoflavonstruktur

Wir hydrolysierten je ca. 20 mg Muningin, Rutin, Quercitrin, Orobol und Aglykon X_2 , indem wir diese Substanzen mit jeweils 10 ml 4%iger wässriger Kalilauge 30 Minuten am Rückfluß im siedenden Wasserbad erhitzen.

81) C.D.DOUGLAS, Q.L.MORRIS u. S.H.WENDER, J.Amer.chem.Soc. 73, 4023 (1951)

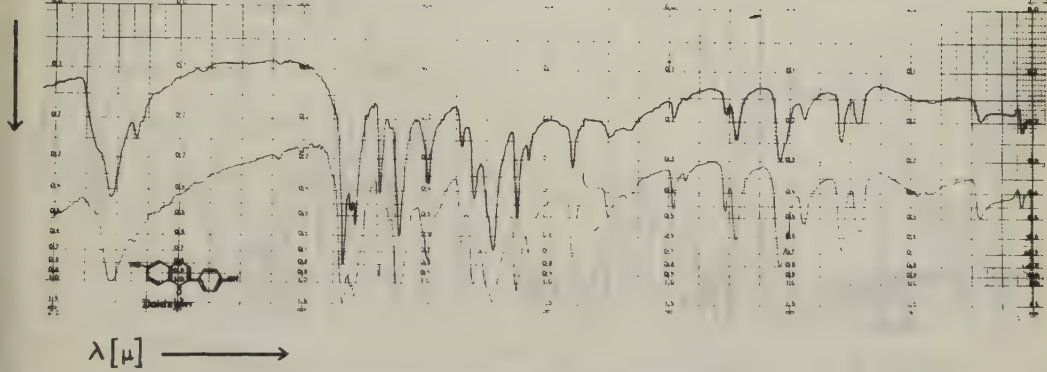
Das erkaltete Hydrolysat säuerten wir im Destillierkölbchen der auf Seite 52 erwähnten Wasserdampfdestillations-Mikroapparatur mit einigen Tropfen 85%iger o-Phosphorsäure "Merck" an und destillierten ca. 2 ml direkt in eine Vorlage von 2 ml 5%iger wässriger Quecksilber-II-chloridlösung über.

Wie die Versuchsergebnisse im Falle der Isoflavone Muningin und Orobol zeigten, war diese Destillatmenge ausreichend zum Nachweis der bei der Molekülspaltung eventuell freigewordenen Ameisensäure. Eine Kontrolldestillation eines angesäuerten Formiats (HCOOK) unter gleichen Versuchsbedingungen lieferte dafür eine weitere Bestätigung.

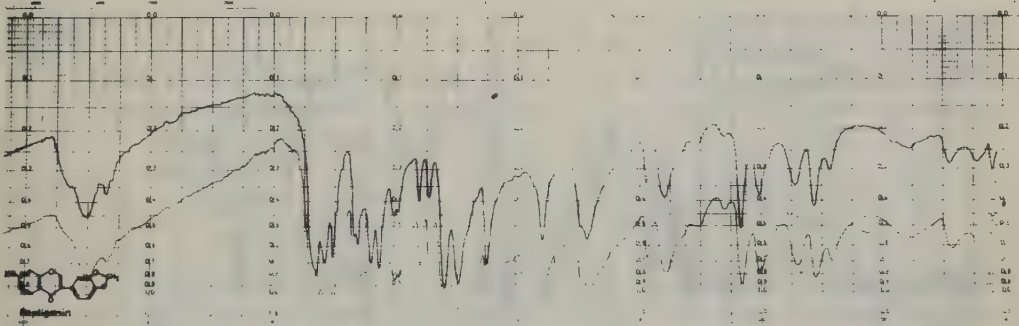
Das Auftreten eines weißen Niederschlags beim zweistündigen Erhitzen des in der Vorlage aufgefangenen Destillats im siedenden Wasserbad zeigte eine positive Reaktion an. Das Destillat, das wir aus dem Alkaliabbau des Aglykons X_2 erhielten, blieb beim zweistündigen Erhitzen mit Quecksilber-II-chloridlösung in der oben beschriebenen Versuchsanordnung klar. Für Aglykon X_2 konnte demzufolge das Vorliegen einer Isoflavonstruktur mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

A N H A N G

$\frac{I_0}{I}$
log
← $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] Abbildung 18 : Daidzein



← $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] Abbildung 19 : Pseudo-Baptigenin



← $\tilde{\nu}$ [cm⁻¹] Abbildung 20 : Muningin

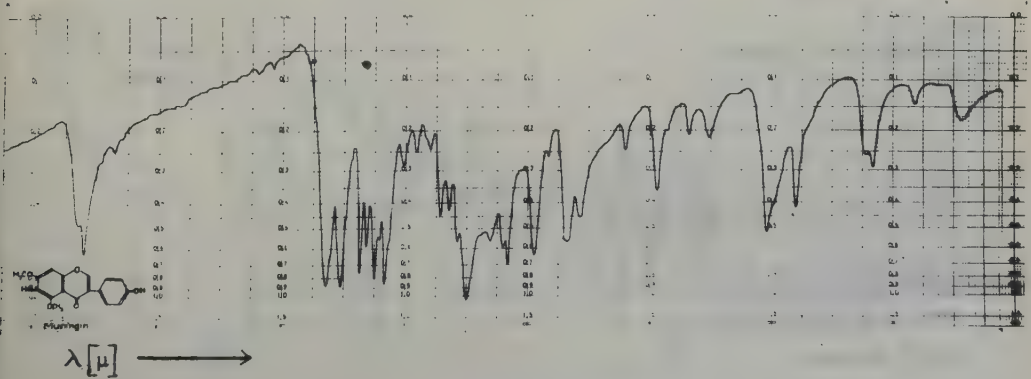


Abbildung 21 : Prunetin

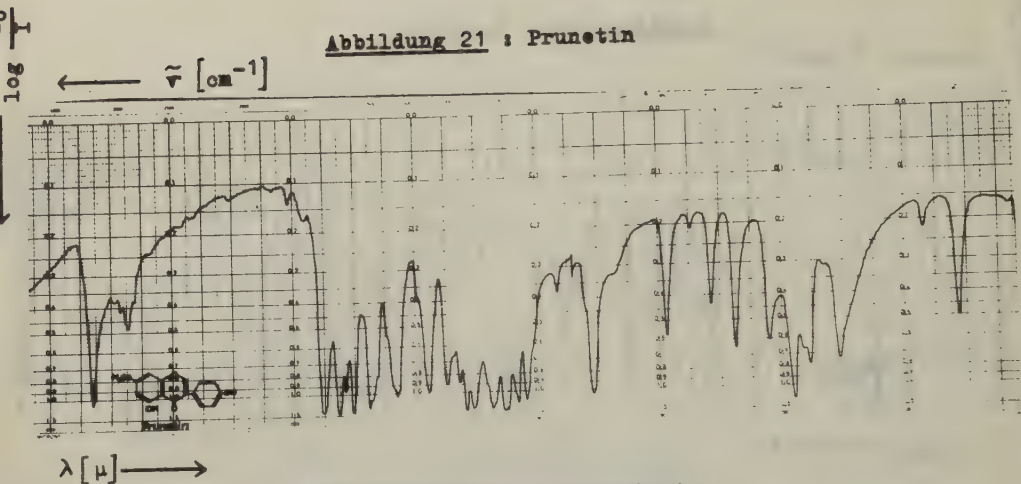


Abbildung 22 : Biochanin A

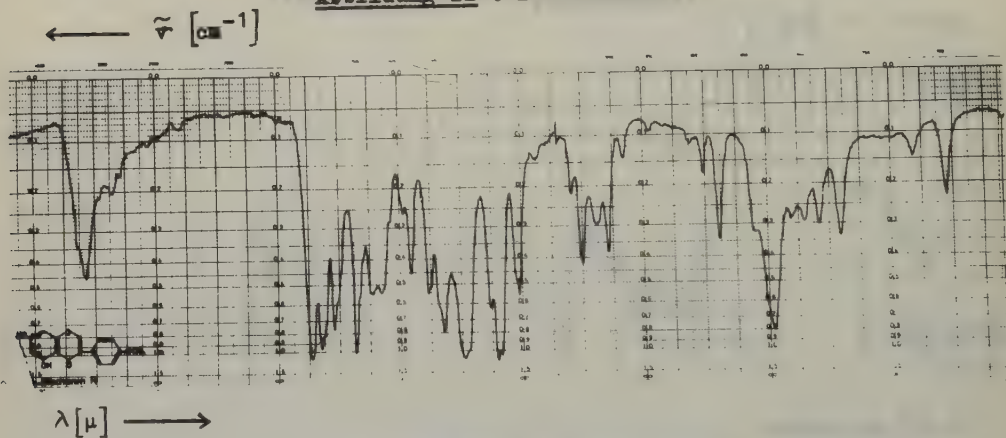


Abbildung 23 : Iridenin

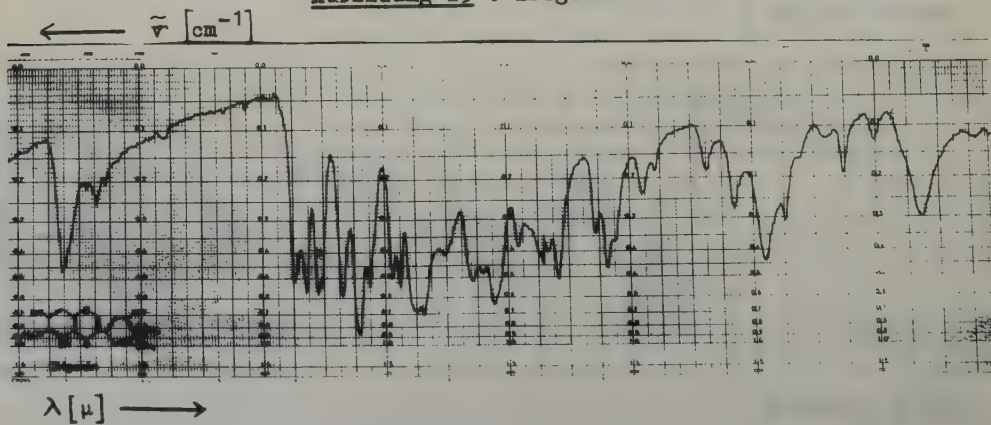


Abbildung 25 : Formononetin

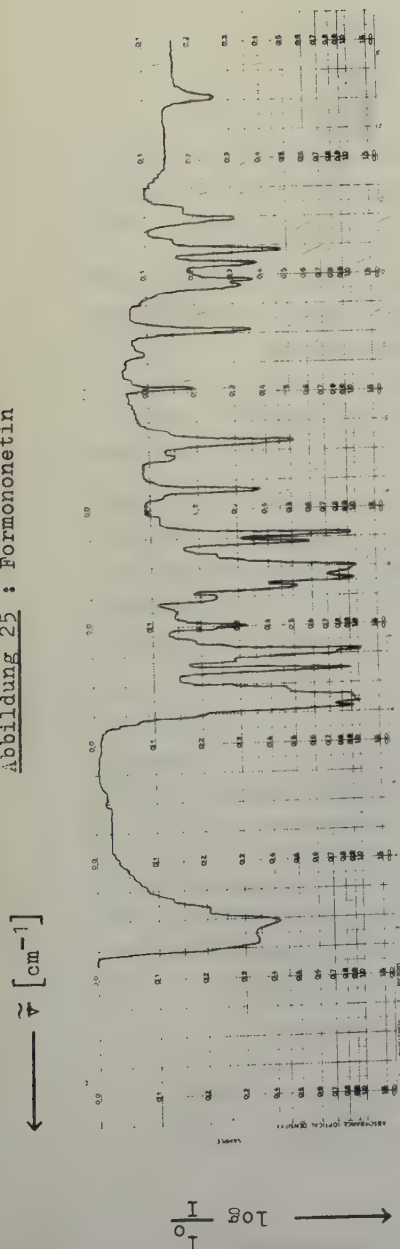


Abbildung 26 : Genistein

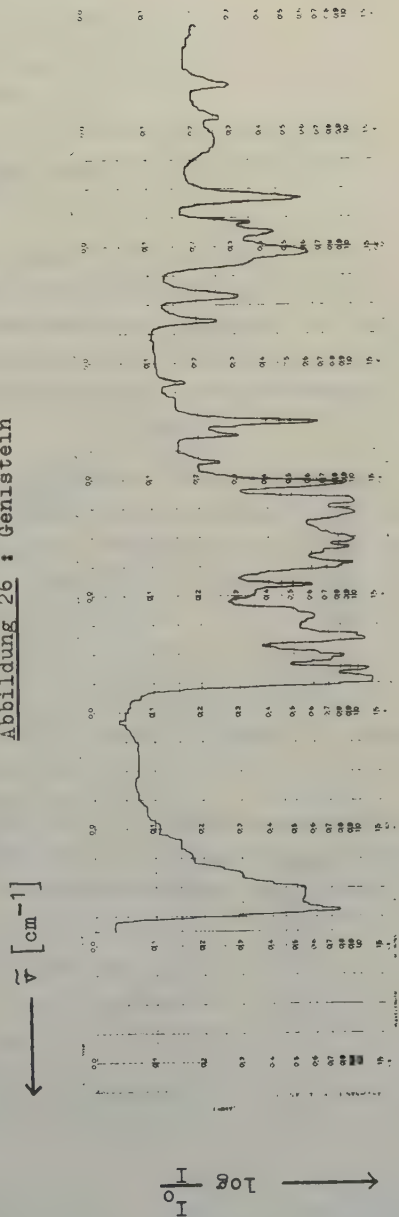
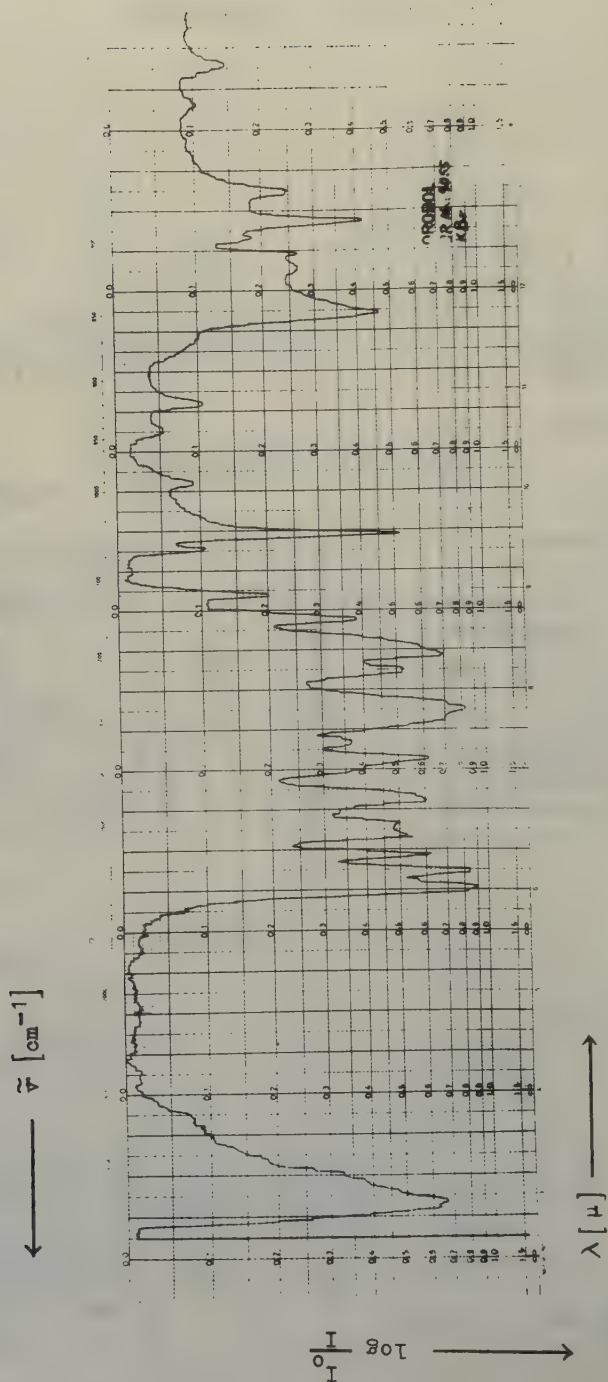


Abbildung 26



Orobol = 5,7,3',4'-Tetra-hydroxy-isoflaven

L e b e n s l a u f

Am 28. Februar 1928 wurde ich als Sohn des Sparkassendirektors Alois Grasmaier und dessen Ehefrau Kunigunde, geb. Gebhard, geboren.

Von 1934 bis Ostern 1938 besuchte ich die Volksschule in Mainburg, anschließend die Oberrealschule in Landshut, an der ich im Juli 1947 die Reifeprüfung ablegte. Bis zum Freiwerden einer Praktikantenstelle in einer Lehrapotheke im März 1948 war ich vorübergehend in der Kreissparkasse Mainburg beschäftigt.

Meine Praktikantenzeit in der Stadt-Apotheke in Mainburg schloß ich am 30.9.1950 mit dem pharmazeutischen Vorexamen in Regensburg ab. Nach 6 Semestern Pharmaziestudium an der Universität München unterzog ich mich im November 1953 mit Erfolg dem pharmazeutischen Staatsexamen.

Vom 1.12.1953 bis 31.5.1954 arbeitete ich als Kandidat in der Mayer'schen Apotheke in Vilsbiburg, ab 1.6.1954 als approbierter Apotheker in verschiedenen Apotheken in Bayern, in der Schweiz und im Rheinland.

Am 1.5.1957 begann ich am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München unter der Anleitung von Herrn Professor Dr. L. Hörhammer mit der Ausarbeitung der vorliegenden Arbeit.

